

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. КАРАЗІНА**

ПОСОХОВ ЄВГЕН ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 544.1+544.3+544.4+544.7

**ФІЗИКО-ХІМІЧНІ АСПЕКТИ ВЗАЄМОДІЇ З ЛІПІДНИМИ МЕМБРАНАМИ
І ФОТОНІКА БІОЛОГІЧНО ОРІЄНТОВАНИХ СПОЛУК, ВИЗНАЧЕНІ
МЕТОДАМИ ОПТИЧНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ**

02.00.04 – фізична хімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора хімічних наук

Харків - 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Науково-дослідному інституті хімії Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України.

Науковий консультант: доктор хімічних наук, професор
Дорошенко Андрій Олегович
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Міністерства освіти і науки України
професор кафедри органічної хімії,
завідувач відділу фізико-органічної хімії Науково-
дослідного інституту хімії Харківського національного
університету імені В.Н. Каразіна

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, професор
Єременко Ганна Михайлівна
Інститут хімії поверхні імені О. О. Чуйка
Національної академії наук України, м. Київ
провідний науковий співробітник лабораторії фотоніки
поверхні

доктор хімічних наук, професор
Решетняк Олександр Володимирович
Львівський національний університет імені Івана Франка
Міністерства освіти і науки України
завідувач кафедри фізичної та колоїдної хімії

доктор хімічних наук, професор
Іщенко Олександр Олександрович
Інститут органічної хімії
Національної академії наук України, м. Київ
завідувач відділу кольору та будови органічних сполук

Захист відбудеться «14» травня 2015 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.14 Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна (Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-79).

З дисертацією можна ознайомитися у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна (Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4).

Автореферат розісланий «16» березня 2015 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
канд. хім. наук, доцент

О.В. Кириченко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Більшість біологічно активних сполук як ендогенного, так і екзогенного походження або безпосередньо діють на мембрани клітин, або проникають крізь мембрани для того, щоб досягти своїх «цілей» усередині клітин. В обох випадках стадія взаємодії таких сполук з мембраною є одною з найважливіших ланок у молекулярному механізмі їх дії. Залежно від специфіки конкретної біологічно орієнтованої¹ сполуки (БОС) або ліпідних мембран взаємодія БОС з мембранами може залежати як від фізичних (електростатичного потенціалу поверхні, полярності, в'язкості), так і від хімічних чинників (гідратованості мембран, кислотно-основних взаємодій, особливостей будови молекул БОС). З'ясування фізичних і хімічних факторів, що визначають механізми взаємодії тих чи інших біологічно орієнтованих сполук з ліпідними мембранами, є актуальною науковою проблемою, певному вирішенню якої присвячена ця дисертаційна робота. Важливим інструментом для дослідження взаємодії біологічно орієнтованих сполук з ліпідними мембранами є оптична спектроскопія. У контексті застосування спектроскопії як для детекції БОС, так і для вивчення їх взаємодії з ліпідними мембранами становить інтерес дослідження фотоніки БОС, тобто природи та ефективності первинних фотофізичних і фотохімічних процесів, що відбуваються у збудженому стані цих сполук.

З огляду на практичне застосування, знання механізмів взаємодії БОС з ліпідними мембранами надає можливість цілеспрямовано впливати на цей процес і є принципово важливим під час пошуку нових фармацевтичних препаратів. Дані щодо фотоніки є підґрунтям для розробки нових методологічних підходів і методів оптичної спектроскопії для визначення фізичних і хімічних властивостей, структури і міжмолекулярних взаємодій тих чи інших біологічно орієнтованих сполук.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами та темами. Дисертаційна робота є частиною планових наукових досліджень, що проводились упродовж декількох років у відділі фізико-органічної хімії НДІ хімії Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна в рамках держбюджетних тем: «Внутрішньомолекулярний водневий зв'язок та перенос протона у збудженому стані в молекулах-флуорофорах» (№ держ. реєстрації 0101U002779), «Молекулярні системи з фотопереносом протона і заряду як основа для створення сенсорних матеріалів» (№ держ. реєстрації 0110U000582). У перелічених науково-дослідних роботах дисертант був виконавцем. Частина досліджень проведена у співробітництві з проф. А. Ладохіним (кафедра біохімії Медичного центру Канзаського університету, м. Канзас-Сіті, США) у рамках грантів NIH GM-069783 та NIH GM-069783-S1, а також у групі проф. Я. Валюка (відділ спектроскопії Інституту фізичної хімії Польської академії наук, м. Варшава, Польща) та в групі

¹ Під біологічно орієнтованими сполуками (БОС) у дисертації маються на увазі хімічні сполуки, що застосовуються в біології: (а) біологічно активні сполуки; (б) біологічні макромолекули (пептиди, протеїни); (в) біологічно малоактивні сполуки, що використовуються в біодослідженнях (флуоресцентні зонди, хімічні шаперони тощо).

проф. С. Ічлі (Інститут сонячної енергії Егейського університету, м. Ізмір, Туреччина).

Мета і завдання дослідження: З'ясувати, які фізичні й хімічні чинники визначають механізми взаємодії мембранних протеїнів та цистеїнових пептидів з ліпідними мембранами. Розширити можливості вивчення термодинамічних та кінетичних параметрів взаємодії біологічно орієнтованих сполук з ліпідними мембранами, а також фізичних і хімічних властивостей та структури ліпідних мембран і біологічно орієнтованих сполук шляхом розробки та впровадження нових методологічних підходів і методів оптичної спектроскопії. Визначити природу й ефективність первинних фотофізичних і фотохімічних процесів, що відбуваються у збудженому стані досліджуваних біологічно орієнтованих сполук.

Для досягнення цієї мети було необхідно вирішити такі завдання:

1. Розробити комплекс методів оптичної спектроскопії для моніторингу взаємодії мембранних протеїнів (або гідрофобних пептидів) з ліпідними мембранами:

а) метод із використанням флуоресцентної кореляційної спектроскопії для кількісної оцінки фракції мембранно-компетентної форми модельних мембранних протеїнів анексину B12 і транслокаційного домену (Т-домену) дифтерійного токсину залежно від рН середовища;

б) метод, що ґрунтується на використанні флуоресцентної кореляційної спектроскопії, для оцінки вільної енергії зв'язування модельного мембранного протеїну анексину B12 з ліпідними мембранами;

в) метод визначення термодинамічних параметрів протеїн-ліпідної (або пептид-ліпідної) взаємодії мембранних протеїнів (або гідрофобних пептидів), який ґрунтується на використанні флуоресцентної кореляційної спектроскопії та фторованих поверхнево-активних речовин (ФПАР);

г) метод із використанням флуоресцентної спектроскопії за імпульсного збудження для визначення мембранної топології модельних мембранних протеїнів анексину B12 і Т-домену дифтерійного токсину;

д) метод із використанням Ферстерівського резонансного переносу енергії електронного збудження для кількісної оцінки фракції мембранно-компетентної форми Т-домену дифтерійного токсину залежно від рН середовища, який дає можливість проводити визначення кінетичних параметрів зв'язування протеїну з мембраною.

2. За даними вимірювань динаміки зміни інтенсивності флуоресценції за стаціонарного збудження визначити механізм вбудовування Т-домену дифтерійного токсину в ліпідну мембрану, а саме: виявити наявність інтермедіату вбудовування залежно від кислотності середовища й ліпідного складу мембран.

3. Удосконалити методику флуоресцентного титрування для підвищення точності оцінки термодинамічних параметрів мембранного зв'язування цистеїнових пептидів - блокаторів іонних каналів.

4. Запропонувати і розробити спосіб корекції в оцінці ефективності Ферстерівського резонансного переносу енергії електронного збудження в ході

дослідження самоасоціації пептидів/протеїнів у мембранах, який ґрунтується на застосуванні флуоресцентної спектроскопії за імпульсного збудження.

5. За допомогою флуоресцентної спектроскопії за імпульсного збудження встановити механізм гасіння флуоресценції в гістидин-вмісних пептидах, що мічені органічними флуорофорами й утворюють комплекси з іонами перехідних металів, знання якого є важливим для розробки флуоресцентних методів реєстрації змін конформації пептидів низької молекулярної маси.

6. Розробити методологічний підхід із застосуванням комплексу методів оптичної спектроскопії для з'ясування можливості використання фторованих поверхнево-активних речовин як середовища при оцінці термодинамічних параметрів взаємодії мембранних протеїнів з ліпідними мембранами.

7. З'ясувати можливість використання похідних 1,3-оксазолу й 1,3,4-оксадіазолу як флуоресцентних зондів для дослідження біооб'єктів, зокрема для оцінки локальних фізико-хімічних властивостей та структури біомембран: для виявлення змін у клітинних мембранах під дією летких органічних сполук, кріопротекторів, магнітного поля та електромагнітного випромінювання, а також у випадку судинної патології, що спостерігається у пацієнтів, клітинні зразки яких взято на дослідження.

8. Вивчити спектрально-флуоресцентні властивості протиракового препарату камптотецину, деяких речовин природного походження, виділених з турецьких лишайників, а також низки похідних арилімінохіноліну для з'ясування можливості визначення цих сполук за допомогою оптичної спектроскопії. Застосовуючи UV/VIS спектроскопію, визначити розчинність у різних органічних розчинниках ряду похідних діїміду 1,4,5,8-нафталін-тетракарбонової кислоти.

9. За допомогою ІЧ-спектроскопії (зокрема поляризаційної ІЧ-спектроскопії в умовах низькотемпературної матричної ізоляції в інертному газі) та електронної абсорбційної спектроскопії визначити будову молекули продукту фототрансформації β -тіоксокетонів за низьких температур.

Об'єкт дослідження: взаємодія біологічно орієнтованих сполук з ліпідними мембранами; первинні фотофізичні й фотохімічні процеси, що відбуваються у збудженому стані здатних до флуоресценції фізіологічно-активних сполук і мічених органічними флуорофорами БОС.

Предмет дослідження: електростатичні і гідрофобні взаємодії БОС з ліпідними мембранами; фізичні (заряд БОС, електростатичний потенціал поверхні ліпідних мембран) й хімічні (будова молекул, кислотно-основні властивості) чинники, що визначають механізми взаємодії біологічно орієнтованих сполук з ліпідними мембранами; термодинамічні, кінетичні та структурні параметри пептид-пептидних, пептид- або протеїн-ліпідних взаємодій; спектральні характеристики здатних до флуоресценції фізіологічно-активних сполук (камптотецину, похідних діїміду 1,4,5,8-нафталін-тетракарбонової кислоти, похідних арилімінохіноліну), біологічних макромолекул (цистеїнових пептидів-блокаторів іонних каналів; мічених флуорофорами гідрофобних пептидів, мембранних протеїнів – анексину B12 і транслокаційного домену дифтерійного токсину) і біологічно малоактивних сполук, що застосовуються при біодослідженнях (флуоресцентних зондів – 2,5-

діарил похідних оксазолу та оксадіазолу, мічених флуорофорами фторованих поверхнево-активних речовин, β -тіоксокетонів); зміни спектральних параметрів у ході міжмолекулярних взаємодій БОС (взаємодія мембранний протеїн – фторована поверхнево-активна речовина; пептид-пептидна димеризація; пептид- або протеїн-ліпідні взаємодії тощо) або зміни структури БОС (пептидний/протеїновий фолдинг); природа й ефективність первинних фотофізичних й фотохімічних процесів, що відбуваються у збудженому стані здатних до флуоресценції фізіологічно-активних сполук і мічених органічними флуорофорами БОС (природа процесів гасіння флуоресценції, ефективність Ферстерівського резонансного переносу енергії електронного збудження); фізико-хімічні властивості біомембран (полярність, в'язкість, гідратованість).

Методи дослідження: флуоресцентна спектроскопія за стаціонарного та імпульсного збудження, флуоресцентна кореляційна спектроскопія, електронна абсорбційна спектроскопія в УФ та видимій областях спектра, інфрачервона спектроскопія, спектроскопія кругового дихроїзму. Для інтерпретації експериментальних даних залучалися розрахункові методи: квантово-хімічні напівемпіричні – *AM1*, *PM3*; неемпіричні – *ab initio*, DFT та метод молекулярної динаміки.

Наукова новизна одержаних результатів.

1. Флуоресцентна кореляційна спектроскопія вперше була використана для кількісного аналізу мембранних взаємодій мембранних протеїнів і гідрофобних трансмембранних пептидів. Уперше запропоновано метод, який ґрунтується на використанні флуоресцентної кореляційної спектроскопії, для кількісної оцінки фракції мембранно-компетентної форми модельних мембранних протеїнів анексіну B12 та Т-домену дифтерійного токсину залежно від рН середовища. За допомогою флуоресцентної кореляційної спектроскопії вперше було оцінено ΔG зв'язування з ліпідною мембраною анексіну B12. Уперше запропоновано метод із використанням флуоресцентної кореляційної спектроскопії для оцінки термодинаміки протеїн-ліпідної взаємодії мембранних протеїнів за наявності фторованих поверхнево-активних речовин, який дав можливість оцінити вільну енергію зв'язування з ліпідною мембраною за низьких рН для транслокаційного домену дифтерійного токсину, а також вільну енергію вбудовування в ліпідну мембрану для модельних гідрофобних трансмембранних пептидів різної довжини: WALP23 і WALP27.

2. Явище Ферстерівського резонансного переносу енергії електронного збудження вперше було застосовано для дослідження кінетики процесу зв'язування транслокаційного домену дифтерійного токсину з ліпідною мембраною. Вперше встановлено, що мембранне зв'язування Т-домену відбувається досить швидко (< 1 хвилини), а швидкість зв'язування не залежить від рН і кількості аніонного ліпиду у складі мембран.

3. Моніторинг динаміки зміни інтенсивності флуоресценції за стаціонарного збудження вперше був застосований для виявлення інтермедіату вбудовування транслокаційного домену дифтерійного токсину в ліпідні мембрани та дав можливість показати, що інтермедіат вбудовування може бути стабілізований на поверхні мембран із малим вмістом аніонного ліпиду.

4. Запропоновано новий метод оцінки мембранної топології протеїнів, який ґрунтується на застосуванні флуоресцентної спектроскопії за імпульсного збудження. Цей метод було успішно використано нами для дослідження мембранної топології модельних мембранних протеїнів анексину B12 і транслокаційного домену дифтерійного токсину.

5. Запропоновану в дисертації модифіковану методику флуоресцентного титрування за наявності гасника флуоресценції було вперше успішно використано для з'ясування механізму дії блокерів іонних каналів – цистеїнових пептидів.

6. Запропоновано метод із використанням флуоресцентної спектроскопії при імпульсному збудженні для корекції в оцінці ефективності Ферстерівського резонансного переносу енергії у ході вивчення самоасоціації пептидів/протеїнів. Цей метод було успішно використано нами для дослідження димеризації пептиду FGFR3 в ліпідних мембранах.

7. Флуоресцентна спектроскопія при імпульсному збудженні вперше була застосована для дослідження механізмів гасіння флуоресценції в мічених органічними флуорофорами гістидин-вмісних пептидах під час утворення ними комплексів з іонами перехідних металів. Уперше встановлено, що, всупереч загальноприйнятим уявленням, Ферстерівський резонансний перенос енергії не є механізмом гасіння флуоресценції в досліджених гістидин-вмісних пептидних системах.

8. Флуоресцентні зонди на основі орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3-оксазолу і 1,3,4-оксадіазолу вперше були успішно застосовані в медичних дослідженнях для виявлення патологічних змін у мембранах тромбоцитів у хворих з судинною патологією головного мозку гіпертонічного і атеросклеротичного генезу, для виявлення змін у мембранах клітин нюхового аналізатора в ході токсикологічних досліджень, у біологічних дослідженнях для оцінки мембранотропної активності кріопротекторів і для визначення впливу магнітного поля або електромагнітного випромінювання на біологічні мембрани.

9. Комплексне застосування набору спектроскопічних методів вперше дало можливість показати, що: (а) фторовані поверхнево-активні речовини мають властивості хімічних шаперонів для Т-домену дифтерійного токсину і можуть використовуватися як середовище для дослідження мембранних протеїнів; (б) у ході вбудовування в ліпідну мембрану інгібітору іонних каналів GsMTx4 не відбувається його повної дегідратації; (в) у ході взаємодії транслокаційного домену дифтерійного токсину з ліпідними мембранами вбудовування цього протеїну в мембрани починається ще до досягнення його повного зв'язування з ними.

10. Уперше систематично досліджені спектрально-флуоресцентні властивості протиракового препарату камптотецину, деяких нових речовин природного походження, виділених із турецьких лишайників. За допомогою електронної абсорбційної спектроскопії вперше було систематично досліджено розчинність ряду похідних діїмиду 1,4,5,8-нафталін-тетракарбонової кислоти в органічних розчинниках різної природи.

11. Метод із використанням поляризаційної ІЧ-спектроскопії вперше був застосований для ідентифікації продукту фототрансформації β -тіоксокетонів за умови ізоляції в аргонових матрицях за низьких температур. Уперше було показано,

що продуктом фототрансформації β -тіоксокетонів за низьких температур є тіоенольна форма без внутрішньомолекулярного водневого зв'язку (SH-ротамер).

Усі наукові положення дисертації з урахуванням досягнутого рівня новизни є підґрунтям для вирішення актуальної наукової проблеми – виявлення фізичних і хімічних чинників, що визначають механізми взаємодії біологічно орієнтованих сполук з ліпідними мембранами.

Про новизну та практичне значення роботи свідчить наявність п'ятих патентів України на корисну модель.

Практичне значення одержаних результатів.

1. Запропонований у дисертації набір флуоресцентних зондів на основі орто-гідрокси похідних 2,5-діарил-1,3-оксазолу й 1,3,4-оксадіазолу був використаний для оцінки змін фізико-хімічних характеристик ліпідних мембран у випадку патології або під впливом шкідливих факторів зовнішнього середовища. Наприклад, у дисертації запропоновано спосіб оцінки змін у мембранах тромбоцитів людини за судинної патології, спосіб оцінки мембранотропної активності летких органічних сполук, кріопротекторів, магнітного поля та електромагнітного випромінювання. Спосіб оцінки мембранотропної активності летких органічних сполук було застосовано в ході біолого-медичних досліджень в Інституті неврології, психіатрії та наркології НАМН України (акт впровадження від 14.05.2013). Спосіб оцінки мембранотропної активності кріопротекторів застосовано в біологічних дослідженнях, які проводяться на кафедрі фізіології та на кафедрі біохімії ХНУ імені В.Н. Каразіна (акти впровадження від 25.04.2013). Спосіб визначення впливу магнітного поля або електромагнітного випромінювання на біологічні мембрани застосовано у дослідженнях, які проводяться у відділі генетики НДІ біології ХНУ імені В.Н. Каразіна (акт впровадження від 06.02.2013).

2. Метод оцінки термодинамічних параметрів мембранного зв'язування дає можливість з'ясувати механізм блокування іонних каналів за допомогою цистеїнових пептидів. Знання механізму дії цистеїнових пептидів є принципово важливим під час пошуку потенційних фармацевтичних препаратів для лікування порушень функціонування серцево-судинної системи серед пептидів-токсинів, що містяться в отруті комах: так, досліджений у роботі пептид GsMTx4, виділений з отрути тарантула, блокує механо-чутливі іонні канали і здатний сповільнювати частоту серцебиття у випадку тахікардії.

3. Показано, що анексин B12 та транслокаційний домен дифтерійного токсину можна використовувати як модельні протеїни для вивчення фізичних і хімічних чинників, що визначають механізми взаємодії мембранних протеїнів з ліпідними мембранами. Відомості щодо механізмів взаємодії з ліпідними мембранами (зокрема, відомості про рефолдинг та вбудовування в мембрану) анексину B12 та транслокаційного домену дифтерійного токсину дозволяють виявити фізико-хімічні принципи, які покладені в основу процесів агрегації та стабілізації мембранних протеїнів. Запропоновані в дисертації методи та методологічні підходи (в тому числі, застосування фторованих поверхнево-активних речовин як хімічних шаперонів) для оцінки термодинаміки, кінетики та топології взаємодії транслокаційного домену дифтерійного токсину або анексину B12 з ліпідними

мембранами за низьких рН можуть використовуватися для аналогічних досліджень малорозчинних у воді протеїнів: наприклад, бактеріальних токсинів (дифтерійного, ботулінового), коліцинів тощо.

4. Метод із використанням флуоресцентної спектроскопії при імпульсному збудженні для корекції в оцінці ефективності Ферстерівського резонансного переносу енергії дає можливість знизити систематичні похибки в кількісній оцінці асоціації пептидів/протеїнів у ліпідних мембранах. Наприклад, у дисертації досліджено димеризацію мембранного пептиду FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3) у мембранах, яка є важливою в патогенезі ахондроплазії (синдром карликовості). Запропонований метод корекції в оцінці ефективності Ферстерівського резонансного переносу енергії може бути корисним під час вивчення взаємодії лігандів (наприклад, білкових або пептидних гормонів, пептидів-нейромедіаторів) з рецепторами в ліпідному бішарі.

5. Запропонована в роботі методологія, що ґрунтується на застосуванні флуоресцентної спектроскопії при імпульсному збудженні для дослідження механізмів гасіння флуоресценції в мічених органічними флуорофорами гістидин-вмісних пептидах, що утворюють комплекси з іонами перехідних металів, може використовуватися як підґрунтя для розробки флуоресцентних методів оцінки конформаційних змін олігопептидів (12-15 амінокислотних залишків).

6. Вивчені в роботі спектрально-флуоресцентні властивості протиракового препарату камптотечину, деяких нових натуральних фізіологічно-активних сполук, виділених із турецьких лишайників, й окремих похідних хіноліну відкривають можливість детекції (кількісного та якісного аналізу) цих сполук за допомогою оптичної спектроскопії. Отримані в дисертації відомості про розчинність в органічних розчинниках різної природи ряду похідних діїміду 1,4,5,8-нафталін-тетракарбонової кислоти є корисними для практичного застосування цих сполук.

7. Результати досліджень модельних β -тіоксокетонів можуть бути використані в ході вивчення коливальних спектрів β -дикетонів, які є інтермедіатами в мікробіальному метаболізмі, а також мають антиоксидантні властивості в біологічних системах.

Розроблені в роботі спектроскопічні методи та методологічні підходи можуть бути і вже частково застосовуються в клінічній діагностиці, медико-біологічних дослідженнях, у біології, біохімії.

Особистий внесок здобувача. Формулювання мети дисертаційного дослідження, планування й постановка завдань, розробка й апробація методів досліджень, проведення спектральних вимірювань, аналіз та узагальнення результатів, написання наукових статей, підготовка та представлення наукових доповідей на конференціях, формулювання висновків та основних положень дисертації виконані здобувачем особисто: розроблено ряд спектроскопічних методів та нових методологічних підходів для вивчення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран, а також термодинамічних та структурних параметрів пептид-ліпідної взаємодії цистеїнових пептидів та протеїн-ліпідної взаємодії мембранних протеїнів. Проф. А. Ладохін (Медичний центр Канзаського університету, Канзас-Сіті, США) та проф. Я. Валюк (Інститут фізичної хімії Польської академії наук,

Варшава, Польща) брали участь в обговоренні результатів та написанні ряду наукових статей. Автор висловлює подяку науковому консультанту проф. А.О. Дорошенку (ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків) за участь в обговоренні деяких результатів та надання зразків орто-гідрокси похідних 2,5-діарилоксазолу та оксадіазолу; проф. А. Ладохіну (Медичний центр Канзаського університету, Канзас-Сіті, США), к.б.н. Д.А. Бевзюк (Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України, Харків) та м.н.с. Є.М. Корнієнку (ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків) – за надання біологічних об'єктів; проф. Я. Валюку (Інститут фізичної хімії Польської академії наук, Варшава, Польща), проф. С. Ічлі (Інститут сонячної енергії Егейського університету, Ізмір, Туреччина) – за надання деяких біологічно орієнтованих сполук; к.х.н. О.В. Кириченку (ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків), проф. Є. Ларсену (Роскільдський університет, Роскільд, Данія) – за проведення квантово-хімічних розрахунків та проф. Д. Тобайєсу (Каліфорнійський університет, Ірвайн, США) – за проведення розрахунків методом молекулярної динаміки.

Апробація одержаних результатів. Основні результати дисертації були представлені й обговорювалися на наукових з'їздах та конференціях:

Euroconference Matrix 2001 (Szklarska poreba, Poland, 2001), ICP XX International Conference on Photochemistry (Moscow, Russia, 2001), XVII Turkish National Chemical Congress. (Istanbul, Turkey, 2003), Workshop “Novel Experimental Techniques and Instrumentation” (Lesko, Poland, 2005), Biophysical Society 50-th Annual Meeting (Salt Lake City, Utah, USA, 2006), Biophysical Society 51-th Annual Meeting (Baltimore, Maryland, USA, 2007), Biophysical Society 52-th Annual Meeting/16-th International Biophysics Congress (Long Beach, California, USA, 2008), Biophysical Society 53-rd Annual Meeting (Boston, Massachusetts, USA, 2009), 10th Annual KUMC Biomedical Research Training Program (Kansas City, Kansas, USA, 2009), Biophysical Society 54-th Annual Meeting (San Francisco, USA, 2010), Biophysical Society 56-th Annual Meeting (San Diego, California, USA, 2012), VII Міжнародній науково-технічній конференції «Актуальные вопросы биологической физики и химии, БФФХ-2012» (Севастополь, 2012).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано в 44 наукових працях, серед яких 27 статей у наукових фахових виданнях (у т.ч. 2 одноосібні статті), 12 тез доповідей на фахових вітчизняних і міжнародних наукових конференціях і 5 патентів (у т.ч. – 3 одноосібні патенти).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних літературних джерел з 511 найменувань (57 стор.), та додатку (копії актів впровадження, 7 стор.). Літературний огляд розподілено за чотирма розділами. Загальний обсяг дисертації становить 370 сторінок, містить 41 таблицю (13 стор.) і 129 рисунків (26 стор.).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету, завдання дослідження, наукову новизну й практичне значення роботи. Також описано методи флуоресцентної спектроскопії, розроблені та використані для вивчення взаємодії пептидів/протеїнів з ліпідними мембранами, вивчення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран.

У першому розділі з'ясовано механізми взаємодії мембранних протеїнів (анексину Б12 (АНК) і транслокаційного домену дифтерійного токсину (ТДТ)) з ліпідними мембранами.

Оцінка відносної кількості мембранно-компетентної форми мембранних протеїнів, що вбудовуються в мембрани при низьких рН. Протонування таких протеїнів, що відбувається при низьких рН, спричиняє утворення їх мембранно-компетентної форми (рис. 1), здатної зв'язуватися з ліпідними мембранами. У дисертації запропоновано метод оцінки відносної кількості мембранно-

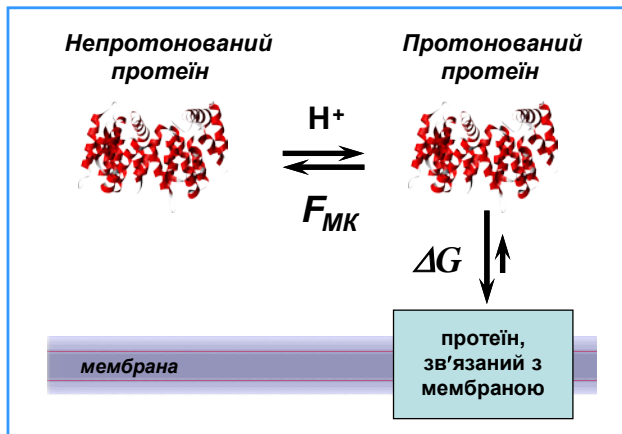


Рис. 1. Схема рН-залежного зв'язування протеїнів з ліпідними мембранами.

компетентної форми протеїнів, що вбудовуються в мембрани при низьких рН, заснований на використанні флуоресцентної кореляційної спектроскопії (ФКС). Метод ґрунтується на різниці швидкостей дифузії вільних і зв'язаних з мембраною молекул протеїнів, мічених флуорофором. У ході ФКС-вимірювань реєструють флуктуації інтенсивності флуоресценції при дифузії малої кількості молекул флуорофору (конц. ~1 наномоль/літр) крізь малий об'єм (~1 фемтолітр). Флуктуації інтенсивності флуоресценції кількісно характеризують за допомогою функції аутокореляції $G(\tau)$.

Експериментальні значення аутокореляційної функції апроксимуються залежністю $g(\tau)$, основним параметром якої є т.зв. кореляційний час (τ_D), за який флуоресцентна частка дифундує крізь малий об'єм, у якому проводиться реєстрація флуоресценції. Для випадку зв'язування протеїнів із ліпідними мембранами розглядаються два види часток, що дифундують: мічений флуорофором вільний протеїн (індекс «п») і ліпідні мембрани, зв'язані з міченим протеїном (індекс «м»):

$$G(\tau) = A_P \cdot g_P(\tau) + A_M \cdot g_M(\tau) \quad (1),$$

де A_P , A_M – параметри, що характеризують внесок функцій $g_P(\tau)$ і $g_M(\tau)$, відповідно. За значного надлишку ліпиду ($\geq 10^4$), коли кожна з ліпосом, зв'язаних з міченим протеїном, містить

тільки одну молекулу протеїну (рис. 2), фракція мембранно-зв'язаного протеїну визначається як:

$$([P]_M/[P]_{\text{заг}}) = (A_M/(A_P + A_M)) \quad (2),$$

де $[P]_M$ і $[P]_{\text{заг}}$ – молярна концентрація мембранно-зв'язаного протеїну та загальна молярна концентрація протеїну, відповідно.

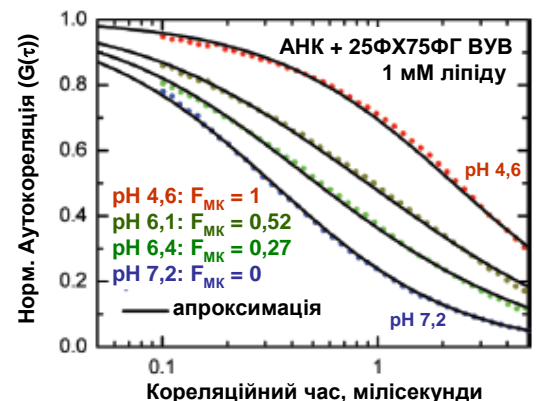


Рис. 2. Аутокореляційні криві, отримані при титруванні анексину Б12 ліпідними мембранами (25ФХ75ФГ) при значному ($\sim 10^6$) надлишку ліпиду при різних рН. ВУВ – великі уніламелярні везикули.

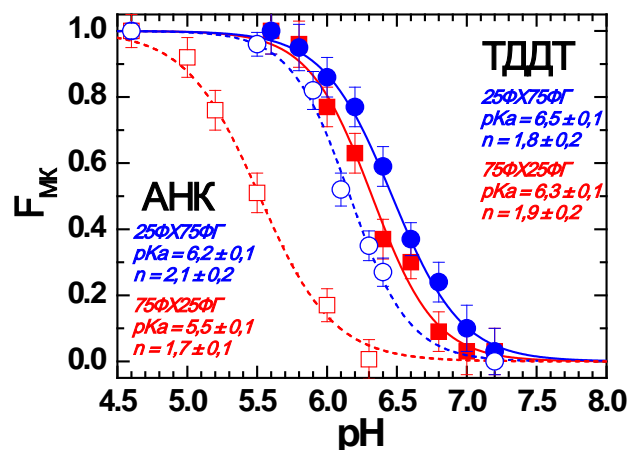
За умови значного надлишку ліпиду ($\sim 10^6$) відносна кількість мембранно-компетентної форми F_{MK} дорівнює фракції мембранно-зв'язаного протеїну, визначеної за формулою (2). Значення відносної кількості мембранно-компетентної форми F_{MK} , отримані при різних рН, апроксимували формулою:

$$F_{MK} = (1/(1+10^{n(pH-pK)})) \quad (3),$$

де pK – від'ємний логарифм константи протонної дисоціації, n – коефіцієнт Хілла.

У дисертації були отримані рН-залежності мембранного зв'язування анексину Б12 і Т-домену дифтерійного токсину, мічених флуорофором Alexa488 (рис. 3).

Рис. 3. Залежність відносної кількості мембранно-компетентної форми (F_{MK}) анексину (АНК, відкриті символи) або транслокаційного домену дифтерійного токсину (ТДДТ, заповнені символи) від рН середовища для мембран з різним ліпідним складом: 25ФХ75ФГ (кружечки), і 75ФХ25ФГ (квадрати). ФХ – фосфатидилхолін, ФГ – фосфатидилгліцерол. Цифри позначають мольний процент.



Беручи до уваги, що концентрація іонів гідрогену біля поверхні ліпідних мембран, що містять аніонні ліпіди, є вищою, ніж відповідна концентрація в об'ємі розчину, отримані дані показують, що утворення мембранно-компетентної форми анексину відбувається біля поверхні ліпідних мембран, у той час як такий процес для Т-домену дифтерійного токсину відбувається в об'ємі розчину далеко від мембран.

Оцінка мембранної топології модельних мембранних протеїнів проводилася за допомогою розробленого нами нового методу, який ґрунтується на вимірюванні часу життя флуоресценції мітки NBD (рис. 4), зв'язаної з вбудованим у ліпідну мембрану протеїном, за відсутності та за наявності гасника флуоресценції LysoUB (зв'язаний з лізоліпідом хромофор UniBlue, рис. 4), що локалізується на поверхні зовнішнього шару мембрани.

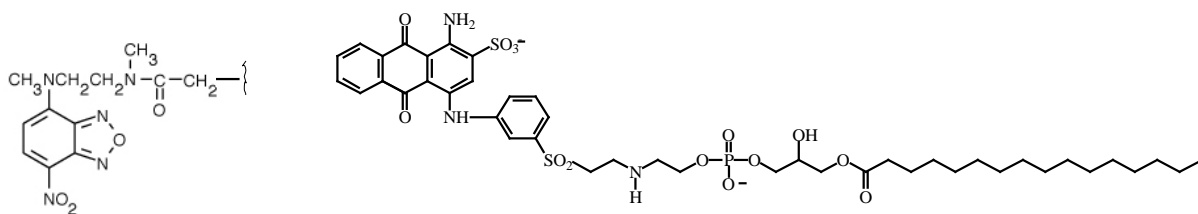
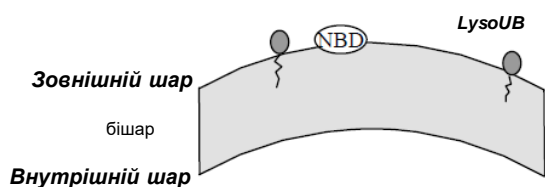


Рис. 4. Ліворуч – мітка NBD, праворуч – LysoUB: гасить флуоресценцію мітки NBD за механізмом Ферстерівського резонансного переносу енергії.

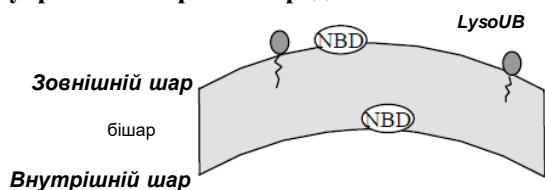
За зміною часу життя мітки NBD в присутності гасника LysoUB оцінюють ефективність Ферстерівського резонансного переносу енергії і роблять висновок щодо мембранної топології вбудовуваних у мембрану протеїнів, тобто про

розташування міченої NBD ділянки протеїну в зовнішньому чи внутрішньому моношарі ліпідної мембрани, або про її рівномірний розподіл між зовнішнім і внутрішнім ліпідними шарами мембрани (рис. 5, 6). Запропонований метод було успішно використано для вивчення мембранної топології анексину B12 (рис. 7) і Т-домену дифтерійного токсину, а також для дослідження механізму взаємодії цих протеїнів із ліпідними мембранами. Було показано, що для анексину B12 та для транслокаційного домену дифтерійного токсину існує інтермедіат вбудовування в мембрану, який локалізується на поверхні ліпідного бішару (рис. 7). Інтермедіат вбудовування може бути стабілізований на поверхні мембран залежно від їх ліпідного складу: у випадку анексину B12 інтермедіат стабілізується за високого вмісту аніонного ліпиду (ФГ) у складі мембран, тоді як у випадку транслокаційного домену дифтерійного токсину стабілізація інтермедіату відбувається за низького вмісту аніонного ліпиду.

А. NBD у зовнішньому шарі: сильне гасіння



Б. рівномірний розподіл NBD між зовнішнім і внутрішнім шарами: середнє гасіння



В. NBD у внутрішньому шарі: слабке гасіння

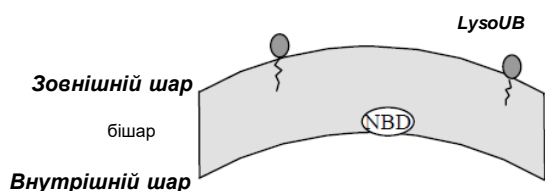


Рис. 5. Схема, що ілюструє ступінь гасіння флуоресценції NBD за допомогою LysoUB залежно від розташування NBD у зовнішній або внутрішній частині ліпідного бішару.

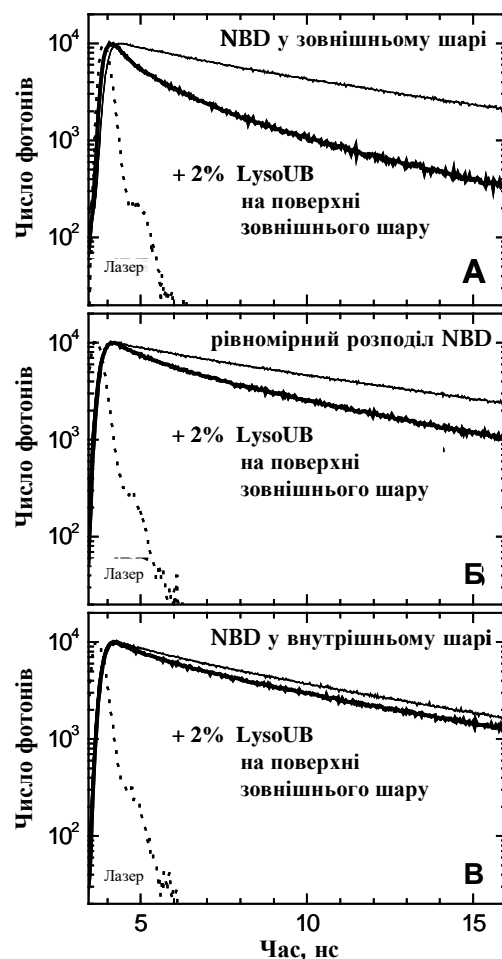


Рис. 6. Криві загасання флуоресценції NBD за відсутності та за наявності LysoUB, виміряні для трьох модельних систем, що відповідають трьом випадкам, представленим на рис. 5

Рис. 7 Схема вбудовування анексину Б12 в ліпідний бішар за низьких рН, що включає водорозчинний стан (В), фінальний трансмембранний стан (Т), інтермедіат на поверхні бішару (І).



Кінетика процесу зв'язування транслокаційного домену дифтерійного токсину з ліпідною мембраною проводилося запропонованим нами методом оцінки відносної кількості мембранно-компетентної форми ТДДТ залежно від рН середовища, який ґрунтується на використанні Ферстерівського резонансного переносу енергії електронного збудження (ФРПЕ). Перенос енергії відбувається між донором енергії електронного збудження (Alexa488), ковалентно зв'язаним з ТДДТ і акцептором енергії електронного збудження (Родамін-ФЕ), ковалентно зв'язаним з ліпідами мембрани: відносну кількість мембранно-компетентної форми протеїну оцінюють за ступенем гасіння флуоресценції донора в ході взаємодії мембранного протеїну з ліпідними мембранами. З огляду на зміну інтенсивності флуоресценції донора в ході мембранного зв'язування транслокаційного домену дифтерійного токсину оцінюють кінетику процесу зв'язування ТДДТ з ліпідними мембранами.

Було встановлено, що мембранне зв'язування Т-домену дифтерійного токсину відбувається досить швидко (< 1 хвилини), а швидкість зв'язування не залежить від рН і кількості аніонного ліпиду у складі мембран.

Кінетика рН-залежного вбудовування транслокаційного домену дифтерійного токсину в ліпідну мембрану була досліджена методом, який ґрунтується на вимірюванні динаміки зміни інтенсивності флуоресценції за стаціонарного збудження. Метод полягає у вимірюванні залежності від часу інтенсивності флуоресценції мітки NBD, зв'язаної з транслокаційним доменом дифтерійного токсину (ТДДТ), при вбудовуванні кон'югату ТДДТ-NBD у ліпідну мембрану. Флуоресценція мітки NBD чутлива до змін полярності й гідратованості її мікрооточення. Установлено, що рН-залежне вбудовування ТДДТ в ліпідні мембрани (рис. 8) відбувається

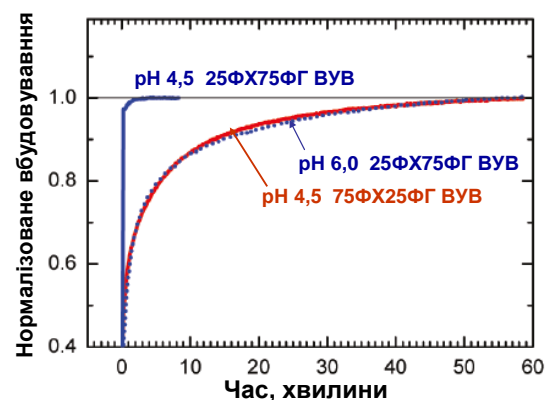


Рис. 8. Залежність інтенсивності флуоресценції кон'югату ТДДТ-NBD від часу при його вбудовуванні у ліпідні мембрани з різним вмістом аніонного ліпиду, виміряна за різних рН.

швидко у випадку мембран з великим вмістом аніонного ліпиду (25ФХ75ФГ) при низьких рН (~4,5), в той же час, вбудовування ТДДТ в мембрани відбувається повільно при більш високих рН (~6,0), а також при низьких значеннях рН у випадку мембран із малим

вмістом аніонного ліпиду (75ФХ25ФГ).

Наявність більш повільного вбудовування вказує на існування рН-залежного інтермедиату вбудовування, стабілізованого при високих рН або у випадку мембран з малим вмістом аніонного ліпиду.

Механізм рН-залежної взаємодії транслокаційного домену дифтерійного токсину з ліпідними мембранами було встановлено за допомогою комбінації двох методів: методу, що використовує Ферстерівський резонансний перенос енергії для оцінки відносної кількості мембранно-компетентної форми мембранних протеїнів, і методу вимірювання динаміки зміни інтенсивності флуоресценції за стаціонарного збудження міченого флуорофором мембранного протеїну при його вбудовуванні в мембрани. Кінетика мембранного зв'язування ТДДТ (рис. 9А) досліджувалася з використанням Ферстерівського резонансного переносу енергії.

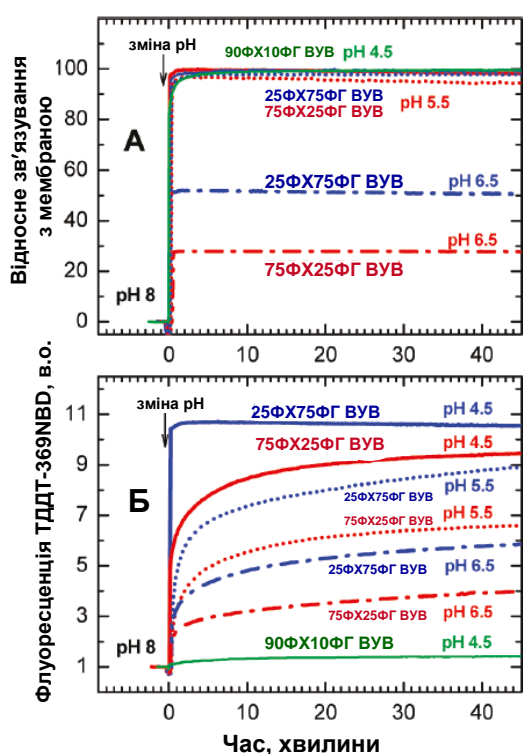


Рис. 9. Кінетика мембранного зв'язування (А) і вбудовування (Б) ТДДТ у мембрани з різним ліпідним складом.

рН-залежне вбудовування Т-домену дифтерійного токсину в ліпідні мембрани

Утворення форми, здатної до зв'язування з мембранами

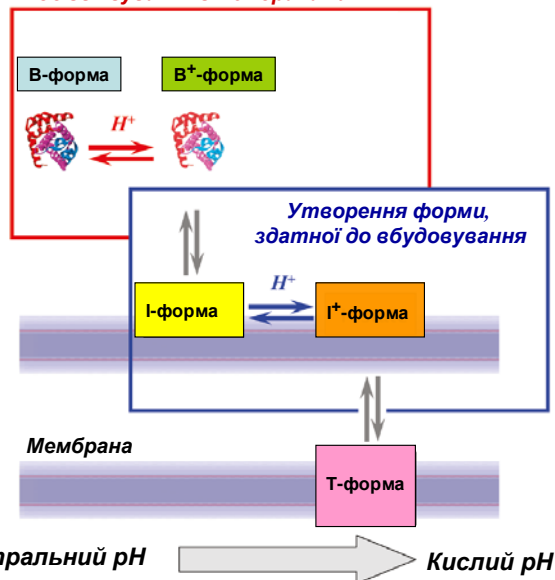


Рис. 10. Схема рН-залежного вбудовування транслокаційного домену дифтерійного токсину в ліпідні мембрани.

Кінетика вбудовування ТДДТ у ліпідні мембрани (рис. 9Б) досліджувалася за допомогою вимірювань динаміки зміни інтенсивності флуоресценції мітки NBD за стаціонарного збудження.

Установлено, що рН-залежне зв'язування ТДДТ з ліпідними мембранами (рис. 9А) відбувається швидко, а відповідне рН-залежне вбудовування ТДДТ в мембрани (рис. 9Б) – досить повільно (особливо для мембран із меншим вмістом заряджених ліпідів), що вказує на наявність рН-залежного інтермедиату вбудовування (рис.10). Показано, що вбудовування ТДДТ в мембрани починається ще до досягнення його повного зв'язування з ними (рис. 9, 10).

У другому розділі описана термодинаміка мембранних взаємодій мембранних протеїнів і гідрофобних трансмембранних пептидів.

Оцінка вільної енергії мембранного зв'язування модельного мембранного протеїну анексину B12 проводилася шляхом визначення відносних кількостей вільного та зв'язаного з мембраною протеїну залежно від загальної концентрації ліпиду. У дисертації вперше проведено оцінку ΔG мембранного зв'язування для анексину B12 (АНК) за допомогою ФКС (рис. 11, 12). Унаслідок відсутності значного надлишку ліпиду (надлишок ліпиду $<10^4$) на початку титрування АНК ліпосомами (рис. 11), кожна з ліпідних мембран, зв'язаних з міченим протеїном, може містити кілька молекул протеїну, що робить неможливим застосування формули (2). За таких умов фракція мембранно-зв'язаного протеїну визначалася за формулою:

$$([P]_M/[P]_{\text{заг}}) = 1 - A_P \cdot N \quad (4),$$

де параметр A_P оцінюється за рівнянням (1), N – кількість мічених флуорофором молекул протеїну у малому об'ємі, в якому проводиться реєстрація флуктуацій інтенсивності флуоресценції. Значення N визначалося в ході ФКС-вимірювання зразка, який містить мічений флуорофором протеїн за відсутності мембран (концентрації протеїну в зразку без мембран і в зразках, що містять ліпідні мембрани, мають бути однаковими).

В умовах значного надлишку ліпиду ($\geq 10^4$) фракція мембранно-зв'язаного протеїну визначалася за формулою (2). Залежність відносної кількості зв'язаного з мембранами протеїну від концентрації ліпиду апроксимували рівнянням:

$$([P]_M/[P]_{\text{заг}}) = F_{MK} \cdot (K_X \cdot [L]/([W] + K_X \cdot [L])) \quad (5),$$

де F_{MK} – частка мембранно-компетентної форми протеїну, що визначається за рівнянням (3); K_X – коефіцієнт міжфазного розподілення протеїну; $[L]$ – молярна концентрація ліпиду; $[W]$ – концентрація води (55,3 M). ΔG мембранного зв'язування протеїнів була обчислена за формулою: $\Delta G = -RT \cdot \ln K_X$. Установлено, що залежно від ліпідного складу мембран або рН середовища значення ΔG для анексину B12 знаходяться в межах $-7,7 \div -12,0$ ккал/моль: наприклад, дорівнює $-11,8 \pm 0,2$ ккал/моль при зв'язуванні з мембранами 25ФХ75ФГ при рН 5,0 і дорівнює $-7,9 \pm 0,2$ ккал/моль при зв'язуванні з мембранами 75ФХ25ФГ при рН 5,5.

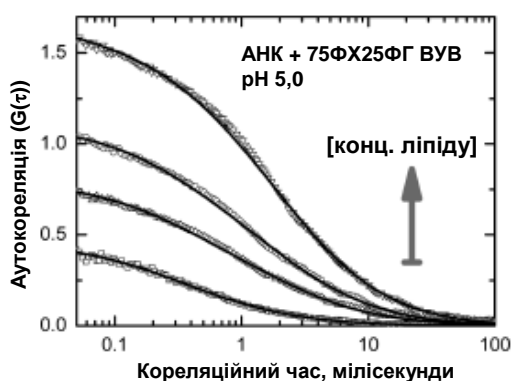


Рис. 11. Аутокореляційні криві, отримані при титруванні анексину ліпідними мембранами (75ФХ25ФГ) за відсутності значного ($\geq 10^4$) надлишку ліпиду.

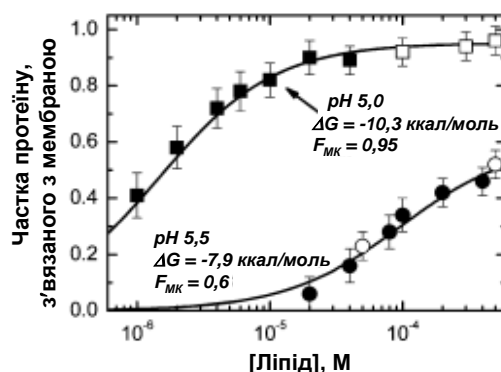


Рис. 12. Ізотерми (293° K) титрування анексину ліпідними мембранами (75ФХ25ФГ) при рН 5,5 (кружечки) і рН 5 (квадрати). Заповнені символи отримані за відсутності надлишку ліпиду (рівняння 4). Відкриті символи відповідають титруванню за надлишку ліпиду (рівняння 2).

Метод оцінки вільної енергії протеїн-ліпідної взаємодії мембранних протеїнів при низьких рН з використанням фторованих поверхнево-активних речовин (ФПАР). Експериментальне визначення вільної енергії протеїн-ліпідної взаємодії мембранних протеїнів утруднене агрегацією й осадженням мембранних протеїнів, що знаходяться поза ліпідними мембранами. Застосування ФПАР дає можливість усунути ці небажані явища (рис. 13) і, таким чином, збільшити розчинність останніх у водному середовищі. На відміну від детергентів, які руйнують мембрану, ФПАР не взаємодіють з ліпідним бішаром, і, таким чином, не порушують структуру останнього. Крім того, ФПАР, утримуючи мембранні протеїни в розчині, сприяють їх взаємодії з ліпідними мембранами, тобто діють як хімічні шаперони.

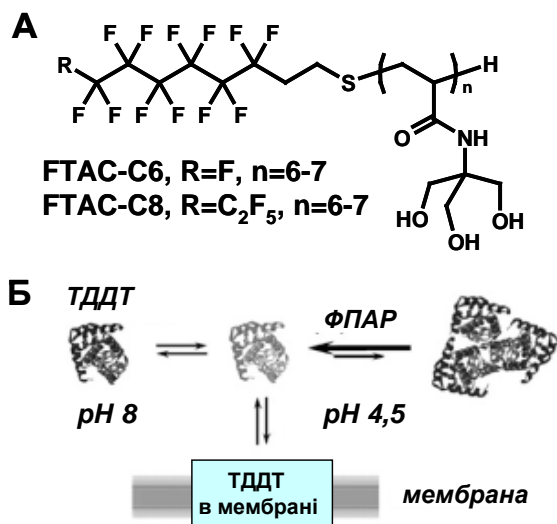


Рис. 13. (А) Структура ФПАР (Б) ФПАР запобігають агрегації Т-домену дифтерійного токсину в водному розчині при низьких рН.

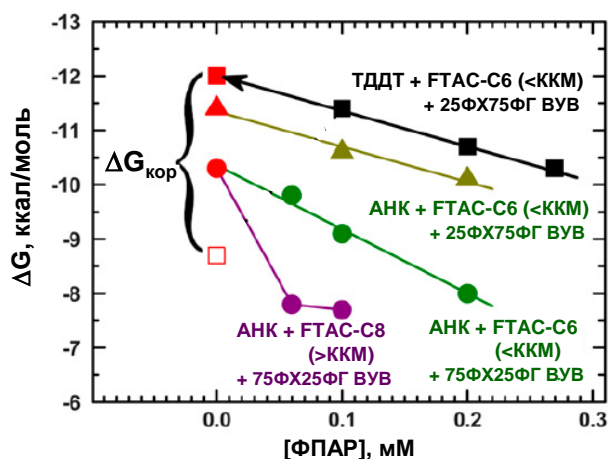


Рис. 14. Визначення корегованої вільної енергії зв'язування протеїнів з ліпідними мембранами при використанні ФПАР.

У дисертації запропоновано метод оцінки вільної енергії взаємодії мембранних протеїнів із ліпідними мембранами, що комбінує шапероноподібну дію ФПАР і чутливість флуоресцентної кореляційної спектроскопії (ФКС). Для верифікації запропонованого методу проводилася оцінка ΔG мембранного зв'язування міченого флуорофором (Alexa488) водорозчинного мембранного протеїну анексину Б12 при його взаємодії з ліпідними мембранами при низьких рН у присутності ФПАР. Результати ФКС-вимірювань апроксимувалися за допомогою рівнянь (1, 2, 4 і 5). Лінійний характер залежності ΔG мембранного зв'язування АНК від концентрації FTAC-C6 (рис. 14, трикутники – мембрани 25ФХ75ФГ і кружечки – мембрани 75ФХ25ФГ) відкриває можливість використання цього ФПАР для з'ясування корегованої вільної енергії мембранного зв'язування протеїнів, яка визначається екстраполяцією до нульової концентрації FTAC-C6. Про точність запропонованого методу свідчить те, що величина ΔG зв'язування АНК з мембранами складу 75ФХ25ФГ, визначена за допомогою обговорюваного методу (рис. 14, $-10,3 \pm 0,1$ ккал/моль), співпала з відповідною величиною, отриманою для АНК за відсутності ФПАР (рис. 12, $-10,3 \pm 0,1$). Запропонований метод був застосований для оцінки скорегованої вільної енергії мембранного зв'язування

Т-домену дифтерійного токсину: ΔG зв'язування ТДДТ з мембранами (25ФХ75ФГ) виявилася рівною $-12,0 \pm 0,1$ ккал/моль (рис.14, заповнений квадрат), тобто на 3,2 ккал/моль (рис. 14, $\Delta G_{\text{кор}}$) відрізняється від уявної ΔG зв'язування (рис. 14, відкритий квадрат), отриманої за відсутності ФПАР, тобто в умовах неврахування агрегації й осадження ТДДТ за низьких рН. Оцінка вільної енергії вбудовування в ліпідну мембрану для гідрофобних трансмембранних пептидів проводилася за допомогою ФКС з використанням ФПАР, аналогічно описаному вище методу. Встановлено, що ΔG вбудовування гідрофобних трансмембранних пептидів WALP23 і WALP27 в ліпідні мембрани дорівнює $-9,0 \pm 0,1$ і $-10,0 \pm 0,1$ ккал/моль, відповідно. Отримані дані щодо термодинаміки взаємодії з ліпідними мембранами використано для перевірки й уточнення октанольної шкали гідрофобності Вімлі-Вайта – експериментальної шкали гідрофобності амінокислотних залишків пептидів і протеїнів.

У третьому розділі з'ясовано механізм дії цистеїнових пептидів – блокаторів іонних каналів (ЦПБІК) шляхом дослідження їх спроможності до взаємодії з ліпідними мембранами

Вільна енергія мембранного зв'язування цистеїнових пептидів-блокаторів іонних каналів. Цистеїнові пептиди, виделені з отрути комах, можуть селективно і з високою афінністю блокувати іонні канали. У літературі² було показано, що дія деяких цистеїнових пептидів-блокаторів іонних каналів здійснюється шляхом їх зв'язування з ліпідним бішаром мембран. На підставі структурної подібності всіх цистеїнових пептидів-блокаторів іонних каналів у літературі² було зроблено припущення, що зв'язування з ліпідним бішаром є важливим для всіх ЦПБІК. В дисертації проведено верифікацію цієї гіпотези шляхом визначення вільної енергії зв'язування ЦПБІК з ліпідними мембранами різного ліпідного складу. Оцінка ΔG мембранного зв'язування ЦПБІК проводилася шляхом флуоресцентного титрування досліджених пептидів ліпідними мембранами. Проте, як виявилось, зміна власної триптофанової флуоресценції для зв'язаних з мембраною цистеїнових пептидів-блокаторів іонних каналів є незначною (рис. 15А). Для створення можливості розрізняти флуоресцентні сигнали для вільних і мембранно-зв'язаних ЦПБІК у дисертації вдосконалено методику флуоресцентного

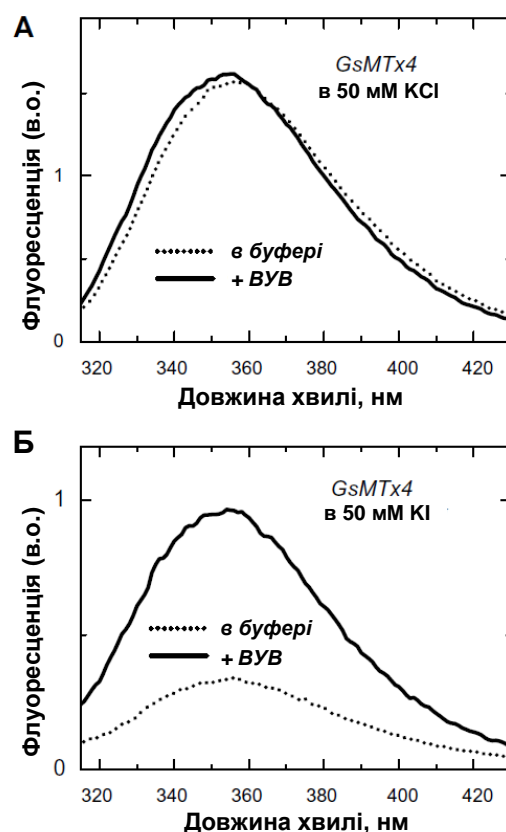


Рис. 15. Спектри флуоресценції пептиду GsMTx4 за відсутності (А) та за наявності (Б) іонного гасника І у водному HEPES-буфері. ВУВ – великі уніламелярні везикули.

² Garcia et al., Nature. 2004, V.430, P. 153-155.; Lee et al., Nature. 2004, V.430, P. 232-235.; Suchina et al., Nature. 2004, V.430, P. 235-240.

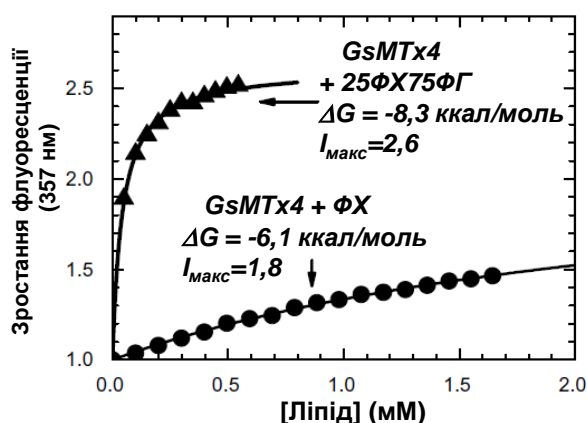


Рис. 16. Флуоресцентне титрування пептиду GsMTx4 ліпідними мембранами за наявності гасника флуоресценції – йодид іону. ФХ-фосфатидилхолін, ФГ-фосфатидилгліцерол.

титрування за рахунок введення у водну фазу неорганічного гасника флуоресценції – йодид іону: традиційний KCl у водному HEPES-буфері був замінений на KI (рис. 15Б). Запропонована модифікація методики дала можливість оцінити вільну енергію зв'язування для деяких ЦПБІК (рис. 16), а також установити, що, незважаючи на структурну подібність усіх цих пептидів, здатність до взаємодії з ліпідними мембранами не є загальною властивістю, притаманною всім ЦПБІК: GsMTx4 зв'язується з цвітеріонними та з аніонними мембранами, тоді як GsMTx1 зв'язується тільки з мембранами з високим вмістом аніонного ліпиду, а rHrTx2gs зовсім не зв'язується з ліпідними мембранами при pH 7,0.

З'ясування можливості неповної дегідратації цистеїнового пептиду GsMTx4 при його зв'язуванні з ліпідною мембраною. Відсутність короткохвильового зсуву триптофанової флуоресценції (рис. 15) вказує на те, що мікрооточення триптофанових залишків GsMTx4 є полярним навіть після зв'язування цього пептиду з мембраною. Разом із тим, результати дистрибутивного аналізу (гасіння бромованими ліпідами із різним положенням атома броду (гасника флуоресценції) уздовж вуглеводневого ланцюга фосфоліпиду) свідчать про те, що GsMTx4 проникає в мембрану досить глибоко (~ 9,2 Å від центра бішару). Отримані експериментальні результати було пояснено можливою неповною дегідратацією GsMTx4 при його вбудовуванні в мембрану. Вірогідність такої неповної дегідратації підтверджує моделювання методом молекулярної динаміки, яке показує, що молекули води проникають разом із пептидом у мембрану досить глибоко й можуть бути присутніми в найближчому мікрооточенні триптофанових залишків пептиду GsMTx4.

У четвертому розділі описана **фотоніка деяких біологічно орієнтованих сполук.**

Спосіб експериментальної корекції в оцінці ефективності Ферстерівського резонансного переносу енергії в ході дослідження самоасоціації пептидів/протеїнів у ліпідних мембранах, який ґрунтується на застосуванні флуоресцентної спектроскопії при імпульсному збудженні.

Кількісна оцінка самоасоціації пептидів/протеїнів у мембранах на підставі оцінки ефективності Ферстерівського резонансного переносу енергії (ФРПЕ) між міченими донорами й акцепторами енергії електронного збудження пептидами/протеїнами, яка проводиться за допомогою флуоресцентної спектроскопії при стаціонарному збудженні ($E^I = (I_d - I_{да})/I_d$, де E^I – загальна ефективність ФРПЕ, I_d й $I_{да}$ – інтенсивності флуоресценції мічених донором пептидів/протеїнів за відсутності та за наявності пептидів, мічених акцепторами, відповідно) завжди є утрудненою унаслідок істотного внеску гасіння донорів у

мономерних молекулах пептидів/протеїнів близько розташованими акцепторами, зв'язаними з мономерними пептидами/протеїнами (рис. 17).

У літературі³ показана можливість застосування теоретичного моделювання в припущенні випадкового розподілу молекул флуорофорів у ліпідному бішарі для оцінки внеску гасіння близько розташованих мономерних донорів і акцепторів до загальної ефективності ФРПЕ при димеризації пептидів/протеїнів у мембрані. Оскільки флуоресценція донора в димерах майже повністю загашена (рис. 17), корекцію ефективності ФРПЕ можна здійснити більш простим способом: реєструючи час життя флуоресценції мічених донором мономерів, що залишилися

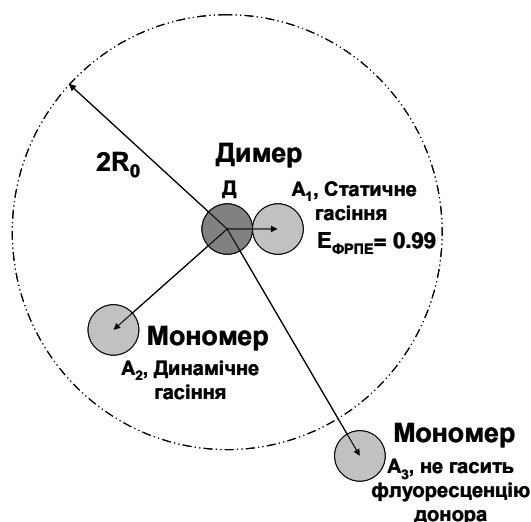


Рис. 17. Різні можливості гасіння флуоресценції донора при димеризації пептиду. «Д» і «А» позначають молекули пептиду, мічені донором і акцептором енергії електронного збудження, відповідно. R_0 – радіус Ферстера. $E_{\text{ФРПЕ}}$ – ефективність ФРПЕ.

теоретичної корекції ФРПЕ. На відміну від методу теоретичної корекції, запропонований спосіб експериментальної корекції ефективності ФРПЕ є більш простим і може застосовуватися навіть у разі не випадкового розподілу донорів й акцепторів енергії електронного збудження в мембрані, наприклад, у ліпідному бішарі з фазово-розділеними ліпідними доменами, в системах, у яких молекули флуорофорів розташовані на заданих відстанях від поверхні бішару і т.д.

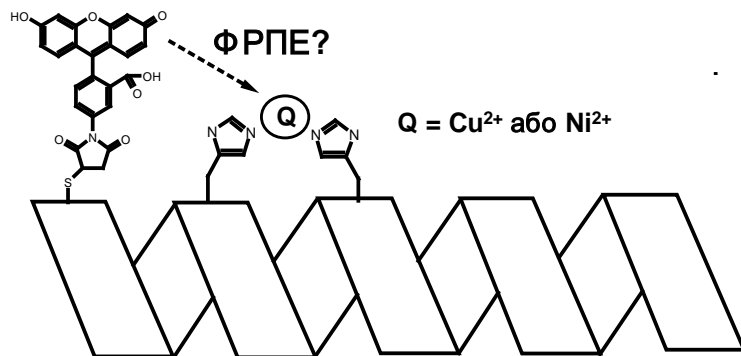
Механізми гасіння флуоресценції в мічених органічними флуорофорами гістидин-вмісних пептидах, що утворюють комплекси з катіонами перехідних металів. Для кількісної оцінки конформаційних змін пептидів, що відбуваються в субнанометровій шкалі, в літературі⁴ пропонується використовувати гасіння зв'язаних із пептидами флуоресцентних міток (флуоресцеїну, біману) іонами перехідних металів (Cu^{2+} , Ni^{2+}), зв'язаних із дигістидиновим фрагментом пептидів

³You et al., *Analyt.Biochem.* 2005, V.340, P. 154-64.

⁴Taraska et al., *Nature Meth.* 2009, V.6, P.532-537

(рис. 18). У літературі⁴ наведено приклади використання флуоресцентної спектроскопії при стаціонарному збудженні для оцінки обговорюваного гасіння флуоресценції в деяких пептидних системах. При цьому передбачається, що гасіння відбувається за механізмом Ферстерівського резонансного переносу енергії, ефективність якого обернено пропорційна відстані між донором і акцептором енергії електронного збудження в шостій ступені.

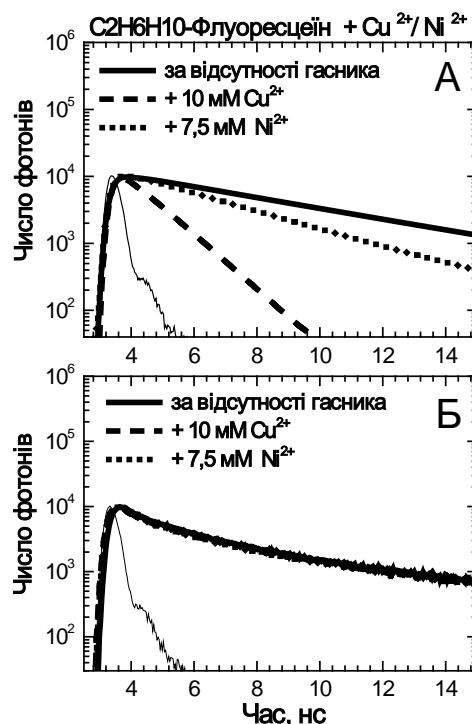
Рис. 18. Схема гасіння флуоресценції міченого флуоресцеїном пептиду C2H6N10 (АСААКНААКНААААКА) іонами перехідних металів у припущенні, що гасіння флуоресценції відбувається за механізмом Ферстерівського резонансного переносу енергії (Taraska et al.).



У дисертації флуоресцентну спектроскопію при імпульсному збудженні було застосовано для з'ясування механізму гасіння в пептидних флуоресцентних системах, використаних⁴ для калібрування залежності ефективності гасіння флуорофору від відстані до іона перехідного металу (рис. 18). На рис. 19А показані модельні кінетичні криві згасання флуоресценції флуоресцеїну, зв'язаного з пептидом C2H6N10, змодельовані для випадку динамічного механізму гасіння флуоресценції іонами перехідних металів, які відповідають результатам вимірювань флуоресценції за стаціонарного збудження⁴. На рис. 19Б показані експериментально виміряні кінетичні криві згасання флуоресценції флуоресцеїну, зв'язаного з пептидом C2H6N10, які відтворили умови вимірювань флуоресценції (Taraska et al) за стаціонарного збудження: криві на рис. 19Б принципово відрізняються від відповідних кривих на рис. 19А.

Рис. 19. (А.) Змодельовані криві згасання флуоресценції при гасінні іонами перехідних металів міченого флуоресцеїном пептиду C2H6N10 в припущенні, що воно відбувається за допомогою Ферстерівського резонансного переносу енергії; (Б) Результати вимірювань флуоресценції при імпульсному збудженні для міченого флуоресцеїном пептиду C2H6N10 за наявності іонів перехідних металів.

Відсутність змін форми кінетичних кривих згасання флуоресценції, наведених на рис. 19Б, вказує на статичний механізм гасіння флуоресценції флуоресцеїну й, отже, свідчить про некоректність застосування теорії Ферстера для інтерпретації результатів експериментів з гасіння флуоресценції зв'язаних із пептидами



органічних флуорофорів іонами перехідних металів. Таким чином, уперше встановлено, що Ферстерівський резонансний перенос енергії не є механізмом гасіння флуоресценції в досліджених гістидин-вмісних пептидах, мічених органічними флуорофорами. Отримані відомості щодо механізму гасіння флуоресценції в гістидин-вмісних пептидах є важливими для проектування нових флуоресцентних систем для моніторингу структурних змін у пептидах.

Оцінка водних розчинів із вмістом фторованих поверхнево-активних речовин як середовища для дослідження мембранних протеїнів проводилася в ході комплексного застосування методів оптичної спектроскопії. За допомогою флуоресцентної кореляційної спектроскопії показано, що мічені флуорофором (Oregon Green488) ФПАР не зв'язуються з ліпідними мембранами і не призводять до елімінування ліпідів з поверхні мембрани. Використання флуоресцентної спектроскопії при стаціонарному збудженні для оцінки Ферстерівського резонансного переносу енергії між молекулами ТДДТ, міченими донором (Alexa532) й акцептором енергії електронного збудження (Alexa647), показало, що ФПАР запобігають агрегації й випадінню в осад ТДДТ. За допомогою спектроскопії кругового дихроїзму показано, що за наявності ФПАР не відбувається значних змін вторинної структури мембранних протеїнів. Використання флуоресцентної спектроскопії при стаціонарному збудженні для детекції мембранного пороутворення показало, що добавка ФПАР завдяки запобіганню агрегації ТДДТ відновлює його здатність до взаємодії з ліпідними мембранами. Вимірювання спектрів збудження флуоресценції для оцінки Ферстерівського резонансного переносу енергії між молекулами ТДДТ, мічених акцептором (Alexa647), і молекулами ФПАР, мічених донором енергії електронного збудження (Oregon Green488), показало, що при вбудовуванні ТДДТ в ліпідну мембрану відбувається видалення молекул ФПАР із першої сольватної сфери білкових молекул. Таким чином, комплексне застосування методів оптичної спектроскопії дозволило показати, що фторовані поверхнево-активні речовини мають властивості хімічних шаперонів.

Набір флуоресцентних зондів для дослідження змін фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран. У дисертації запропоновано набір флуоресцентних зондів для дослідження змін фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран, до складу якого входять шість флуорофорів, що різняться ліпофільністю: 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол (**4.1**); 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-феніл-феніл)-1,3-оксазол (**4.2**); 2-(2'-ОН-феніл)-9,10-фенантр-1,3-оксазол (**4.3**); 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3,4-оксадіазол (**4.4**); 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-N(CH₃)₂-феніл)-1,3,4-оксадіазол (**4.5**), а також 2-феніл [9,10] фенантроксазол (**4.6**), – і, таким чином, характеризуються різною глибиною занурення в ліпідний бішар у ході зв'язування з мембранами.

Використання запропонованого набору флуоресцентних зондів дає можливість: здійснити моніторинг фізико-хімічних властивостей у всіх областях ліпідного бішару клітинних або модельних мембран, підвищити достовірність визначення фізико-хімічних характеристик в мембранах за рахунок зіставлення даних для зондів із різною локалізацією.

Зонди **4.1-4.6** є чутливими до зміни гідратірованості їх мікрооточення, тобто придатні для оцінювання зміни ступеня гідратації ліпідного бішару. Також ці зонди

можуть використовуватися для оцінки зміни ліпофільності клітинних мембран у ході варіювання їх ліпідного складу.

Запропонований набір флуоресцентних зондів успішно використано для визначення патологічних перетворень у мембранах тромбоцитів пацієнтів з судинними захворюваннями головного мозку, а також для визначення мембранотропної активності летких органічних сполук (ЛОС), кріопротекторів, магнітного поля або електромагнітного випромінювання.

У ході визначення патологічних відхилень у мембранах тромбоцитів пацієнтів з судинними захворюваннями головного мозку встановлено, що флуоресцентні зонди **4.2, 4.3, 4.5, 4.6** дозволяють диференціювати перетворення в мембранах тромбоцитів, викликані церебральним атеросклерозом, від трансформацій, спричинених гіпертонічною хворобою. Зонди **4.1** і **4.4** дають можливість виявити зміни мембран тромбоцитів, спільні для обох видів генезу судинної патології головного мозку.

У ході дослідження мембранотропної активності летких органічних сполук було встановлено вплив парів летких органічних розчинників (ацетону й уайт-спіриту) на мембрани клітин нюхового аналізатора шурів. Отримані результати свідчать про накопичення гідратованого ацетону в зонах локалізації зондів **4.1, 4.2, 4.4** в ліпідному бішарі досліджуваних мембран, тобто в області гліцеринових залишків і карбонільних груп фосфоліпідів. Також встановлено, що в результаті впливу уайт-спіриту відбувається збільшення гідратації поверхневих (полярних) областей бішару.

Дослідження мембранотропної активності кріопротекторів дало можливість встановити, що початкова концентрація кріопротектору, яка спричиняє до зміни структури мембрани еритроцита людини, становить 1,5 об. %, 5,0 об. % і 0,5 об. % для диметилсульфоксиду (ДМСО), 1,2-пропандіолу і гліцерину, відповідно. Установлено, що під дією кріопротекторів відбуваються зміни гідратованості мембран еритроцитів в областях локалізації зондів **4.1** і **4.2**, тобто в досить полярних зонах мембрани.

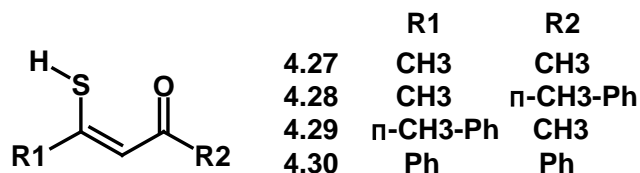
Було встановлено, що під дією магнітного поля або електромагнітного випромінювання на клітини букального епітелію людини відбувається збільшення гідратації полярних областей ліпідних мембран цих клітин.

Пошук потенційних флуоресцентних зондів серед похідних 1,3,4-оксадіазолу та 1,3-оксазолу. У дисертації досліджено спектрально-флуоресцентні та сольватохромні властивості ряду 2-(3'-кумариніл)-5-(2'-(R-аміно)-феніл)-1,3,4-оксадіазолів та 5-R-2-(хінолін-2 або 4-іл)-1,3-бензоксазолів. Було встановлено, що положення максимумів флуоресценції 2-(3'-кумариніл)-5-(2'-(R-аміно)-феніл)-1,3,4-оксадіазолів та 5-метил-2-(хінолін-2 або 4-іл)-1,3-бензоксазолів залежить від динаміки релаксації молекул розчинника у найближчій сольватній сфері електронно-збуджених молекул цих сполук. Це дає можливість запропонувати перелічені сполуки як потенційні рігідохромні флуоресцентні зонди, для яких є характерним гіпсохромний зсув смуг флуоресценції за зростання жорсткості навколишнього середовища.

Ідентифікація продукту фототрансформації β -тіоксокетонів проводилася за допомогою комплексного дослідження методами інфрачервоної та електронної

абсорбційної спектроскопії за умов матричної ізоляції в інертному газі за низьких температур. β -тіоксокетони здатні до фотоізомеризації за низьких температур ($\leq 77^\circ \text{K}$) при опроміненні світлом 370-420 нм. Порівняння експериментальних і теоретичних ІЧ-спектрів досліджуваних β -тіоксокетонів показало, що єдиним фотопродуктом для **4.27**, **4.29**, **4.30** і переважним фотопродуктом для **4.28** є нехелатна форма тіоенолу (SH-ротамер) (рис. 20).

Рис. 20. Фотопродукт досліджених тіоксокетонів, зареєстрований за допомогою ІЧ-спектроскопії після фотоізомеризації.



Оскільки спектри електронного поглинання вихідної форми й фототаутомера β -тіоксокетонів різняться, то за допомогою електронної абсорбційної спектроскопії можна реєструвати зворотне утворення вихідної форми з фотопродукту в 3-метілпентані залежно від часу за різних температур в інтервалі 93-120 °K. За отриманими кінетичними кривими було обчислено значення енергії активації утворення вихідної форми досліджених β -тіоксокетонів: $7,6 \pm 0,2$ ккал/моль для **4.27**; $7,2 \pm 0,4$ ккал/моль – **4.28**; $6,8 \pm 0,4$ ккал/моль – **4.29**; $6,9 \pm 0,4$ ккал/моль – **4.30**. Отримані значення наближені до літературних величин для обертання навколо C–S зв'язку в молекулі тіооцтової кислоти ($7,0 \div 7,3$ ккал/моль), що є вагомим аргументом на користь того, що за низьких температур фотопродуктом для всіх β -тіоксокетонів є нехелатна форма тіоенолу (SH-ротамер, рис. 20).

ВИСНОВКИ

Визначено фізичні й хімічні чинники, що регулюють механізми взаємодії з ліпідними мембранами мембранних протеїнів та цистеїнових пептидів. Розширено можливості вивчення термодинамічних та кінетичних параметрів взаємодій біологічно орієнтованих сполук з ліпідними мембранами, зокрема пептид-ліпідної взаємодії цистеїнових та гідрофобних пептидів і протеїн-ліпідної взаємодії мембранних протеїнів, а також фізичних і хімічних властивостей та структури ліпідних мембран і БОС шляхом розробки та впровадження нових методологічних підходів і методів оптичної спектроскопії. Визначено природу й ефективність первинних фотофізичних і фотохімічних процесів, що відбуваються у збудженому стані молекул деяких флуоресцентних зондів, здатних до флуоресценції фізіологічно-активних сполук і мічених органічними флуорофорами БОС.

1. За допомогою методів оптичної спектроскопії було з'ясовано механізми взаємодії мембранних протеїнів (анексину B12 і транслокаційного домену дифтерійного токсину) з ліпідними мембранами:

а) розробленим нами методом оцінки кількості мембранно-компетентної форми модельних мембранних протеїнів з рН-регульованим вбудовуванням (анексину B12 і Т-домену дифтерійного токсину), який ґрунтується на застосуванні флуоресцентної кореляційної спектроскопії, встановлено, що утворення мембранно-компетентної форми анексину відбувається біля поверхні ліпідних мембран, у той

час як аналогічний процес для Т-домену дифтерійного токсину відбувається в об'ємі розчину;

б) за допомогою розробленого нами нового методу оцінки мембранної топології протеїнів, який ґрунтується на використанні флуоресцентної спектроскопії за імпульсного збудження, було показано, що для анексину B12 та транслокаційного домену дифтерійного токсину існує інтермедіат вбудовування в ліпідні мембрани, який локалізується на поверхні ліпідного бішару. Встановлено, що інтермедіат вбудовування може бути стабілізований залежно від ліпідного складу мембран: у випадку анексину B12 – за високого вмісту аніонного ліпиду у складі мембран, тоді як у випадку транслокаційного домену дифтерійного токсину стабілізація інтермедіату відбувається за низького вмісту аніонного ліпиду;

в) запропонованим нами методом оцінки кількості мембранно-компетентної форми транслокаційного домену дифтерійного токсину (ТДДТ) залежно від рН середовища, який ґрунтується на застосуванні Ферстерівського резонансного переносу енергії (ФРПЕ) і дає можливість проводити кінетичні дослідження процесу зв'язування протеїну з мембраною, було встановлено, що мембранне зв'язування ТДДТ відбувається досить швидко (за час < 1 хвилини), а швидкість зв'язування не залежить від рН і кількості аніонного ліпиду у складі мембран;

г) методом, який ґрунтується на вимірюванні динаміки зміни інтенсивності флуоресценції за стаціонарного збудження, установлено, що рН-залежне вбудовування транслокаційного домену дифтерійного токсину в ліпідні мембрани відбувається швидко (< 2 хвилин) у випадку мембран з великим вмістом аніонного ліпиду при низьких рН ($\sim 4,5$), в той час, як вбудовування ТДДТ в мембрани відбувається повільно (десятки хвилин) при більш високих рН ($\sim 6,0$), а також при низьких значеннях рН у випадку мембран із малим вмістом аніонного ліпиду. Наявність більш повільного вбудовування пояснено існуванням рН-залежного інтермедіату вбудовування, стабілізованого при високих рН або у випадку мембран з малим вмістом аніонного ліпиду;

д) комплексне застосування Ферстерівського резонансного переносу енергії й вимірювань динаміки зміни інтенсивності флуоресценції за стаціонарного збудження дало можливість виявити дві стадії рН-залежної взаємодії транслокаційного домену дифтерійного токсину з ліпідними мембранами, а саме: швидке рН-залежне зв'язування з мембранами й повільне рН-залежне вбудовування в мембрани, а також уперше встановити, що ці стадії не є послідовними, а вбудовування ТДДТ в мембрани починається ще до досягнення його повного зв'язування з ними.

2. Флуоресцентна кореляційна спектроскопія вперше була використана для дослідження термодинаміки мембранних взаємодій мембранних протеїнів і гідрофобних трансмембранних пептидів:

а) уперше було оцінено вільну енергію зв'язування з ліпідними мембранами для анексину B12, яка дорівнює $-11,8 \pm 0,2$ ккал/моль при зв'язуванні з мембранами з високим вмістом аніонного ліпиду при рН 5,0;

б) для оцінки термодинаміки протеїн-ліпідної взаємодії малорозчинних у воді мембранних протеїнів уперше запропоновано метод із використанням фторованих

поверхнево-активних речовин, який дозволив коректно оцінити вільну енергію зв'язування з ліпідними мембранами при низьких рН для транслокаційного домену дифтерійного токсину за умов відсутності його агрегації й осадження: знайдена ΔG зв'язування Т-домену з мембранами з високим вмістом аніонного ліпиду дорівнює - $12,0 \pm 0,1$ ккал/моль;

в) уперше запропоновано метод оцінки термодинаміки пептид-ліпідної взаємодії малорозчинних у воді гідрофобних трансмембранних пептидів з використанням поверхнево-активних речовин, який дав можливість оцінити вільну енергію вбудовування в ліпідну мембрану для гідрофобних пептидів різної довжини, а саме WALP23 і WALP27: знайдені ΔG їх вбудовування в мембрани з цвтеріонного ліпиду дорівнюють $-9,0 \pm 0,1$ та $-10,0 \pm 0,1$ ккал/моль, відповідно. Отримані дані щодо термодинаміки взаємодії з ліпідними мембранами використано для перевірки й уточнення октанольної шкали Вімлі-Вайта – експериментальної шкали гідрофобності амінокислотних залишків пептидів і протеїнів.

3. Для поліпшення точності оцінки термодинамічних параметрів мембранного зв'язування цистеїнових пептидів – блокаторів іонних каналів, було вдосконалено методика флуоресцентного титрування за наявності водорозчинного гасника флуоресценції. Запропонована методика була успішно використана для з'ясування механізму дії цистеїнових пептидів – було показано, що, незважаючи на структурну подібність, вони розділяються на три типи залежно від спроможності до взаємодії з ліпідними мембранами: перший тип – пептиди, які зв'язуються як із цвтеріонними, так і з аніонними мембранами; другий тип – блокатори, які зв'язуються тільки з мембранами з високим вмістом аніонного ліпиду; третій тип – пептиди, які не зв'язуються з мембранами при фізіологічних значеннях рН. Застосування методів флуоресцентної спектроскопії за стаціонарного збудження (вимірювання флуоресценції триптофанових амінокислотних залишків цистеїнового пептиду GsMTx4 при вбудовуванні в ліпідну мембрану, яка не містить гасників флуоресценції й відповідне вимірювання флуоресценції цього пептиду при вбудовуванні в ліпідні мембрани, що містять гасник флуоресценції з різною глибиною локалізації в мембрані), а також комп'ютерне моделювання методом молекулярної динаміки вперше дали можливість встановити, що при вбудовуванні в ліпідну мембрану інгібітору іонних каналів GsMTx4 не відбувається повної дегідратації його триптофанових амінокислотних залишків.

4. Запропоновано спосіб експериментальної корекції в оцінці ефективності Ферстерівського резонансного переносу енергії при вивченні самоасоціації пептидів/протеїнів у мембранах, який ґрунтується на застосуванні флуоресцентної спектроскопії за імпульсного збудження. Вищезазначений спосіб використано при вивченні димеризації пептиду FGFR3 в ліпідних мембранах. На відміну від загальноприйнятого у теперішній час способу теоретичної корекції, запропонований підхід є більш простим і може застосовуватися навіть у разі нерівномірного розподілу молекул донорів й акцепторів енергії електронного збудження в мембрані.

5. Флуоресцентна спектроскопія за імпульсного збудження була застосована для з'ясування механізму гасіння флуоресценції в мічених органічними

флуорофорами гістидин-вмісних пептидах, що утворюють комплекси з катіонами перехідних металів: встановлено, що, всупереч існуючим уявленням, Ферстерівський резонансний перенос енергії не є механізмом гасіння флуоресценції в розглянутому випадку. Отримані відомості щодо механізму гасіння флуоресценції в гістидин-вмісних пептидах є важливими при проектуванні нових флуоресцентних систем для моніторингу структурних змін у пептидах.

6. Комплексне застосування набору методів оптичної спектроскопії, а саме: спектроскопії кругового дихроїзму, флуоресцентної кореляційної спектроскопії, флуоресцентної спектроскопії за стаціонарного збудження, Ферстерівського резонансного переносу енергії й методу флуоресцентної детекції мембранного пороутворення, – вперше дало можливість показати, що фторовані поверхнево-активні речовини мають властивості хімічних шаперонів для Т-домену дифтерійного токсину та можуть використовуватися як середовище для дослідження мембранних протеїнів.

7. Показана можливість застосування похідних 1,3-оксазолу та 1,3,4-оксадіазолу як флуоресцентних зондів для дослідження біологічних об'єктів: запропоновано набір зондів для виявлення змін фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран, що включає декілька орто-гідрокси похідних 2,5-дифеніл-1,3-оксазолу, 2,5-дифеніл-1,3,4-оксадіазолу, а також 2-феніл[9,10]фенантроксазол. Установлено, що запропонований набір флуоресцентних зондів дає можливість виявляти зміни в мембранах тромбоцитів у пацієнтів з судинною патологією головного мозку гіпертонічного й атеросклеротичного генезу, а також зміни в мембранах клітин нюхового аналізатора в ході токсикологічних досліджень, проводити оцінку мембранотропної активності кріопротекторів і впливу магнітного поля або електромагнітного випромінювання на біологічні мембрани. Показано, що флуоресцентні властивості деяких похідних 2-кумариніл-1,3,4-оксадіазолу і 2-хінолініл-1,3-бензоксазолу чутливі до динаміки релаксації молекул розчинника, що дає можливість запропонувати ці сполуки як потенційні ригідохромні флуоресцентні зонди.

8. Для з'ясування можливості детекції за допомогою оптичної спектроскопії вперше систематично досліджені спектрально-флуоресцентні властивості протиракового препарату камптотецину, деяких нових фізіологічно-активних продуктів, виділених із турецьких лишайників, а також низки похідних арилімінохіноліну. За допомогою електронної абсорбційної спектроскопії вперше була оцінена розчинність ряду похідних діїмиду 1,4,5,8-нафталін-тетракарбонової кислоти в органічних розчинниках різної природи.

9. За допомогою комплексного дослідження методами інфрачервоної та електронної абсорбційної спектроскопії показано, що за низьких температур ($\leq 77^\circ \text{K}$) продуктом фотоіндукованої трансформації β -тіоксокетонів є тіоенольна форма без внутрішньомолекулярного водневого зв'язку (SH-ротамер).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових наукових виданнях:

1. Посохов Е.А. 2-феніл[9,10]фенантроксазол и 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3,4-оксадіазол в качестве флуоресцентных зондов для исследования изменений в

- мембранах тромбоцитів при атеросклерозі / Е.А. Посохов // Вісник Харківського національного університету. – 2012. – №. 1026, серія «хімія», вип. 21 (44). – С. 112-121.
2. Spectral-luminescent and solvatochromic properties of 2-(3'-coumarinyl)-5-(2'-(R-amino)-phenyl)-1,3,4-oxadiazoles / Y. Posokhov, K. Sytnik, K. Ocakoglu, M. Kus, S. Icli // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2012. – V. 227. – P. 25-31. (*Формулювання завдання, участь у виконанні експерименту, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті*).
 3. Thermodynamic measurements of bilayer insertion of a single transmembrane helix chaperoned by fluorinated surfactants / A. Kyrychenko, M.V. Rodnin, Y.O. Posokhov, A. Holt, B. Pucci, J.A. Killian, A.S. Ladokhin // Journal of Molecular Biology. – 2012. – V. 416. – P. 328-334. (*Участь у формулюванні завдань дослідження, розробці методики спектроскопічних вимірювань, дослідження термодинаміки протеїн-ліпідної взаємодії, участь в інтерпретації результатів, написанні статті*).
 4. Посохов Е.А. Орто-гидроксипроизводные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований мембран клеток обонятельного анализатора крыс / Е.А. Посохов // Вісник Харківського національного університету. – 2011. – №. 976, серія «хімія», вип. 20 (43). – С. 92-99.
 5. Posokhov Y.O. Steady-state and time-resolved fluorescence quenching with transition metal ions as short-distance probes for protein conformation / Y.O. Posokhov, A. Kyrychenko, A.S. Ladokhin // Analytical Biochemistry. – 2010. – V. 407. – P. 284-286. (*Участь у формулюванні завдань дослідження, вивчення механізму гасіння флуоресценції, участь в інтерпретації результатів і написанні статті*).
 6. Kinetic intermediate reveals staggered pH-dependent transitions along the membrane insertion pathway of the diphtheria toxin T-domain / A. Kyrychenko, Y.O. Posokhov, M.V. Rodnin, A.S. Ladokhin // Biochemistry. – 2009. – V. 48, No. 32. – P. 7584-7594. (*Планування експерименту, розробка методик спектроскопічних вимірювань, дослідження кінетики протеїн-ліпідної взаємодії, участь в інтерпретації результатів, написанні статті*).
 7. FCS study of thermodynamic of membrane protein insertion into the lipid bilayer chaperoned by fluorinated surfactants / Y.O. Posokhov, M.V. Rodnin, S.K. Das, B. Pucci, A.S. Ladokhin // Biophys J. – 2008. – V. 9, No. 8. – P. L54-L56. (*Участь у формулюванні завдань дослідження, розробці методики спектроскопічних вимірювань, дослідження термодинаміки протеїн-ліпідної взаємодії, участь в інтерпретації результатів, написанні статті*).
 8. Membrane insertion pathway of annexin B12: thermodynamic and kinetic characterization by fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence quenching / Y.O. Posokhov, M.V. Rodnin, L. Lu, A.S. Ladokhin // Biochemistry. – 2008. – V. 47, No. 18. – P. 5078-5087. (*Планування експерименту, розробка методик спектроскопічних вимірювань, з'ясування механізму взаємодії протеїну з ліпідними мембранами, участь в інтерпретації результатів, написанні статті*).
 9. Interactions of fluorinated surfactants with diphtheria toxin T-domain: testing new media for studies of membrane proteins / M.V. Rodnin, Y.O. Posokhov, C. Contino-Pepin,

- J. Brettman, A. Kyrychenko, S.S. Palchevskyy, B. Pucci, A.S. Ladokhin // *Biophys J.* – 2008. – V. 94, No. 11. – P. 4348-4357. (Планування експерименту, розробка методик спектроскопічних вимірювань, дослідження взаємодії фторованих ПАР з мембранним протеїном, участь в інтерпретації результатів, написанні статті).
10. A simple “proximity” correction for Förster resonance energy transfer efficiency determination in membranes using lifetime measurements / Y.O. Posokhov, M. Merzlyakov, K. Hristova, A.S. Ladokhin // *Analytical Biochemistry.* – 2008. – V. 380. – P. 134-136. (Участь у формулюванні завдань дослідження, планування експерименту, оцінка ефективності переносу енергії при вивченні самоасоціації пептидів у мембранах, участь в інтерпретації результатів, написанні статті).
 11. Monothiodibenzoylmethane: structural and vibrational assignments / B.K.V. Hansen, A. Gorski, Y. Posokhov, F. Duus, P.E. Hansen, J. Waluk, J. Spanget-Larsen // *Vibrational Spectroscopy.* – 2007. – V. 43. – P. 53–63. (Участь у формулюванні завдань дослідження, виконанні експерименту, інтерпретації результатів, написанні статті).
 12. Photochromism in p-methylbenzoylthioacetone and related β -thioxoketones / A. Gorski, Y. Posokhov, B.K.V. Hansen, J. Spanget-Larsen, J. Jasny, F. Duus, P.E. Hansen, J. Waluk // *Chemical Physics.* – 2007. – V. 338. – P. 11-22. (Участь у формулюванні завдань дослідження, виконанні експерименту, в інтерпретації результатів, написанні статті).
 13. Is lipid bilayer binding a common property of inhibitor cysteine knot ion-channel blockers? / Y.O. Posokhov, P.A. Gottlieb, M.J. Morales, F. Sachs, A.S. Ladokhin // *Biophys J.* – 2007. – V. 93, No. 4. – P. L20-L22. (Планування експерименту, розробка методики спектроскопічних вимірювань, з'ясування механізму взаємодії цистеїнових пептидів з ліпідними мембранами, участь в інтерпретації результатів, написанні статті).
 14. Posokhov Y.O. Quenching-enhanced fluorescence titration protocol for accurate determination of free energy of membrane binding / Y.O. Posokhov, P.A. Gottlieb, A.S. Ladokhin // *Analytical Biochemistry.* – 2007. – V. 362. – P. 290-292. (Участь у формулюванні завдань дослідження, розробці методики спектроскопічних вимірювань, оцінка вільної енергії мембранного зв'язування, участь в інтерпретації результатів, написанні статті).
 15. Spectrophotometric determination of Cu^{2+} with quinolinyl derivative in organic and aqueous solutions / N. Avcibasi, Y. Posokhov, K. Ocakoglu, C. Varlicli, M. Kus, G. Turkmen, M. Gumus, F. Tugcu, E. Aydemir, S. Kaban // *Asian Journal of Chemistry.* – 2007. – V. 19. – P. 1930-1942. (Участь у формулюванні завдань дослідження, виконанні експерименту, інтерпретація результатів і написання статті).
 16. Chaperoning of membrane protein insertion into lipid bilayers by hemifluorinated surfactants: application to diphtheria toxin / S.S. Palchevskyy, Y.O. Posokhov, B. Olivier, J.L. Popot, B. Pucci, A.S. Ladokhin // *Biochemistry.* – 2006. – V. 45. – P. 2629-2635. (Участь у плануванні експерименту, дослідження взаємодії фторованих ПАР з мембранним протеїном, участь в інтерпретації результатів, написанні статті).
 17. Posokhov Y.O. Lifetime fluorescence method for determining membrane topology of proteins / Y.O. Posokhov, A.S. Ladokhin // *Analytical Biochemistry.* – 2006. – V. 348.

- P. 87-93. (*Участь у формулюванні завдань дослідження, розробка методики спектроскопічних вимірювань, дослідження структури вбудованого в ліпідну мембрану протеїну, участь в інтерпретації результатів, написанні статті*).
18. Photochromism and polarization spectroscopy of p-methyl(thiobenzoyl)acetone / A. Gorski, Y. Posokhov, B.K.V. Hansen, J. Spanget-Larsen, J. Jasny, F. Duus, P.E. Hansen, J. Waluk. // Chemical Physics. – 2006. – V. 328. – P. 205-215. (*Участь у формулюванні завдань дослідження, виконанні експерименту, в інтерпретації результатів, написанні статті*).
 19. Spectral-fluorescent properties of new 5-R-2-(quinolin-2-yl)-and 5-R-2-(quinolin-4-yl)-1,3-benzoxazoles / Y. Posokhov, K. Ocakoglu, G. Gonul, N. Avcibashi, M. Gumus, F. Tugcu, E. Aydemir, S. Kaban, S. Icli // Asian Journal of Chemistry. – 2006. – V. 18. – P. 827-839. (*Участь у формулюванні завдань дослідження, виконанні експерименту, в інтерпретації результатів, написанні статті*).
 20. The study of the solubility of naphthalene diimides with various bulky flanking substituents in different solvents by UV/VIS spectroscopy / S. Erten, Y. Posokhov, S. Alp, S. İçli // Dyes & Pigments. – 2005. – V. 64. – P. 171-178. (*Участь у формулюванні завдань дослідження, виконанні експерименту, інтерпретація результатів, написання статті*).
 21. UV/VIS spectral properties of novel natural products from turkish lichens / Y. Posokhov, S. Erten, O. Koz, H. Anıl, S. Kırmızıgül, S. İçli // International Journal of Photoenergy. – 2005. – V. 7, No. 1. – P. 27-35. (*Планування експерименту, дослідження спектральних властивостей біоактивних сполук, інтерпретація результатів і написання статті*).
 22. Thioacetylacetone: structural and vibrational assignments / Y. Posokhov, A. Gorsky, J. Spanget-Larsen, F. Duus, P.E. Hansen, J. Waluk // Chem. Phys. Chem. – 2004. – V. 5. – P. 495-502. (*Участь у формулюванні завдань дослідження, виконанні експерименту, в інтерпретації результатів, написанні статті*).
 23. Spectral properties and complex formation with Cu²⁺ ions of 2- and 4-(N-arylimino)-quinolines / Y. Posokhov, M. Kuş, H. Biner, S. Kaban, S. İçli // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2004. – V. 161. – P. 247-254. (*Участь у формулюванні завдань дослідження, виконанні експерименту, інтерпретація результатів, написання статті*).
 24. Photophysical properties and electrochemistry of the N,N'-bis-n-butyl derivative of naphthalene diimide / Y. Posokhov, S. Alp, B. Köz, Y. Dilgin, S. İçli // Turk J. Chem. – 2004. – V. 28. – P. 415-424. (*Проведення спектральних досліджень, участь в інтерпретації результатів, написанні статті*).
 25. Posokhov Y. Spectral-luminescent and solvatochromic properties of anticancer drug camptothecin / Y. Posokhov, H. Biner, S. Icli // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2003. – V. 158. – P. 13-20. (*Формулювання завдань дослідження, участь у виконанні експерименту, інтерпретація результатів, написання статті*).
 26. The structure of the phototransformation product of monothiodibenzoylmethane / Y. Posokhov, A. Gorsky, J. Spanget-Larsen., F. Duus, P.E. Hansen, J. Waluk // Chem. Phys. Lett. – 2001. – V. 350. – P. 502-508. (*Участь у формулюванні завдань*

дослідження, виконанні експерименту, в інтерпретації результатів, написанні статті).

27. Посохов Е.А. Орто-гидрокси производные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований модельных биомембран / Е.А. Посохов, Т.П. Бойко, Д.А. Бевзюк // Вісник Харківського національного університету. – 2001. – №. 532, серія «хімія», вип. 7 (30). – С. 192-194. (Участь у формулюванні завдань дослідження, планування експерименту, проведення спектроскопічних вимірювань, обговорення та узагальнення результатів, написання статті).

Тези доповідей на наукових конференціях:

28. Посохов Е.А. Оценка воздействия магнитного поля на свойства мембран клеток буккального эпителия человека с помощью флуоресцентных зондов / Е.А. Посохов, В.Н. Пасюга, Ю.Г. Шкорбатов // Актуальні питання біологічної фізики і хімії (БФФХ-2012): матеріали VIII міжнар. конф., 23-27 квітня 2012 р.: тези доповідей. – Севастополь, 2012. – С. 64-66.
29. Thermodynamic measurements of bilayer insertion of a single transmembrane helix / A. Kyrychenko, M.V. Rodnin, Y.O. Posokhov, A. Holt, B. Pucci, A. Killian, A.S. Ladokhin // BPS 56-th Annual Meeting, 25-29 February 2012: CD of abstracts. – San Diego, California, USA, 2012. – 2398-Pos.
30. Thermodynamic of interfacial membrane binding and transmembrane insertion of diphtheria toxin T-domain: fluorescence correlation spectroscopy study / Y.O. Posokhov, M.V. Rodnin, A. Kyrychenko, C. Contino, B. Pucci, A.S. Ladokhin // BPS 54-th Annual Meeting, 20-24 February 2010: CD of abstracts. – San Francisco, USA, 2010. – 3245-Plat.
31. Posokhov Y.O. Membrane interactions of the cysteine knot (CK) family of ion-channel blockers / Y.O. Posokhov // 10th Annual KUMC Biomedical Research Training Program, May 11, 2009: Book of abstracts. – Kansas City, Kansas, USA, 2009. – P. 11.
- 32A. pH-Triggered membrane insertion pathway of the diphtheria toxin T-domain: 1. insertion/refolding intermediate / A. Kyrychenko, M.V. Rodnin, Y.O. Posokhov, A.S. Ladokhin // BPS 53-rd Annual Meeting, 28 February – 4 March 2009: CD of abstracts. – Boston, Massachusetts, USA, 2009. – 2231-Pos.
- 32Б. Can we measure the thermodynamic stability of membrane proteins in a lipid bilayer environment? / Y.O. Posokhov, M.V. Rodnin, A. Kyrychenko, A. Holt, C. Contino-Pepin, B. Pucci, J.A. Killian, A.S. Ladokhin // BPS 53-rd Annual Meeting, 28 February – 4 March 2009: CD of abstracts. – Boston, Massachusetts, USA, 2009. – 1706-Pos.
- 32В. Posokhov Y.O. Membrane partitioning of mechanosensitive channel inhibitor GsMTx4: characterization by depth-dependent fluorescence quenching and molecular dynamics simulations / Y.O. Posokhov // BPS 53-rd Annual Meeting, 28 February – 4 March 2009: CD of abstracts. – Boston, Massachusetts, USA, 2009. – 3154-Pos.
- 33A. Incomplete dehydration of the hydrophobic face of the mechanosensitive channel inhibitor GsMTx4 during membrane partitioning / Y.O. Posokhov, J. Alfredo Freitas, P.A. Gottlieb, F. Sachs, D.J. Tobias, A.S. Ladokhin // BPS 52-th Annual Meeting/16-th

- International Biophysics Congress, 2-6 February 2008: CD of abstracts. – Long Beach, California, USA, 2008. – 2042-Pos.
- 33B. Posokhov Y.O. Thermodynamics of membrane protein insertion/folding: fluorescence correlation spectroscopy study of annexin B12 / Y.O. Posokhov, M.V. Rodnin, A.S. Ladokhin // BPS 52-th Annual Meeting/16-th International Biophysics Congress, 2-6 February 2008: CD of abstracts. – Long Beach, California, USA, 2008. – 1929-Pos.
- 33B. Fluorinated surfactants as chaperones for insertion/folding of membrane proteins / Y.O. Posokhov, A. Kyrychenko, M.V. Rodnin, J. Brettmann, C. Contino, B. Pucci, A.S. Ladokhin // BPS 52-th Annual Meeting/16-th International Biophysics Congress, 2-6 February 2008: CD of abstracts. – Long Beach, California, USA, 2008. – 1859-Plat.
- 34A. Experimental and molecular dynamics (MD) characterization of membrane interactions of the cysteine knot (CK) family of ion-channel blockers / Y.O. Posokhov, J.A. Freites, P.A. Gottlieb, F. Sachs, D.J. Tobias, A.S. Ladokhin // BPS 51-th Annual Meeting, 3-7 March 2007: CD of abstracts. – Baltimore, Maryland, USA, 2007. – 2595-Plat.
- 34B. Fluorescence correlation spectroscopy study of the energetics of bilayer insertion of membrane proteins / Y.O. Posokhov, S.K. Das, M.V. Rodnin, B. Olivier, B. Pucci, A.S. Ladokhin // BPS 51-th Annual Meeting, 3-7 March 2007: CD of abstracts. – Baltimore, Maryland, USA, 2007. – 926-Plat.
- 34B. Comparison of chaperone-like ability of various fluorinated surfactants for bilayer insertion of a model membrane protein / M.V. Rodnin, D. Pechak, S.S. Palchevskyy, Y.O. Posokhov, S.K. Das, B. Olivier, B. Pucci, A.S. Ladokhin // BPS 51-th Annual Meeting, 3-7 March 2007: CD of abstracts. – Baltimore, Maryland, USA, 2007. – 323-Pos.
- 35A. Fluorinated surfactants chaperone bilayer insertion of a model membrane protein / S.S. Palchevskyy, Y.O. Posokhov, B. Olivier, J.L. Popot, B. Pucci, A.S. Ladokhin // BPS 50-th Annual Meeting, 18-22 February 2006: CD of abstracts. – Salt Lake City, Utah, USA, 2006. – 1529-Plat.
- 35B. Quantitative characterization of membrane interactions of the cysteine knot (CK) family of ion-channel blockers / Y.O. Posokhov, P. Gottlieb, M.J. Morales, F. Sachs, A.S. Ladokhin // BPS 50-th Annual Meeting, 18-22 February 2006: CD of abstracts. – Salt Lake City, Utah, USA, 2006. – 301-Pos.
36. Photoorientation and depolarization: two complementary ways of studying molecular structure and dynamics / A. Gorski, Y. Posokhov, F. Duus, J. Spanget-Larsen, P.E. Hansen, J. Waluk // Novel Experimental Techniques and Instrumentation: workshop, 5-11 June 2005: Book of abstracts. – Lesko, Poland, 2005. – P. 5.
- 37A. UV/VIS spectral properties of naphthalene diimides with bulky substituents / S. Erten, Y. Posokhov, S. Alp, S. İcli // XVII Turkish National Chemical Congress, 8-11 September 2003: Book of abstracts. – Istanbul, Turkey, 2003. – P. 569.
- 37B. Differently substituted 2- and 4-(N-arylimino)-quinolines: spectral-fluorescent properties and complex formation with Cu²⁺ ions / M. Kus, K. Ocakoglu, Y. Posokhov, H. Biner, S. Kaban, S. Icli // XVII Turkish National Chemical Congress, 8-11 September 2003: Book of abstracts. – Istanbul, Turkey, 2003. – P. 84.
38. Mechanisms of photoreactions in β -thioxoketones / Y. Posokhov, A. Gorski, J. Spanget-Larsen, F. Duus, P.E. Hansen, J. Waluk // ICP XX International Conference on Photochemistry, 30 July – 4 August 2001: Book of abstracts. – Moscow, Russia, 2001. – P. 579.

39. The Mechanism of phototransformation of monothiodibenzoylmethane / Y. Posokhov, A. Gorski, J. Spanget-Larsen, F. Duus, P.E. Hansen, J. Waluk // Euroconference Matrix 2001, 7-13 July 2001: Book of abstracts. – Szklarska poreba, Poland, 2001. – P. 2-15.

Патенти

40. Пат. 76399 Україна. МПК G01N 33/483, G01N 21/64 (2006.01). Спосіб визначення впливу магнітного або електромагнітного поля на біологічні мембрани/ Є.О. Посохов, В.М. Пасюга, М.М. Колчигін, Ю.Г. Шкорбатов; заявник і власник патенту Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – №U201204116; заявл. 03.04.2012; опубл. 10.01.2013, Бюл. № 1. (*Визначення змін фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран за допомогою флуоресцентних зондів. Особистий внесок: формулювання завдання, участь у виконанні експерименту, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до публікації*).
41. Пат. 71516 Україна. МПК G01N 33/483 (2006.01). Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротектора / Є.О. Посохов, Є.М. Корнієнко; заявник і власник патенту Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – №U201202917; заявл. 12.03.2012; опубл. 10.07.2012, Бюл. № 13. (*Визначення змін фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран за допомогою флуоресцентних зондів. Особистий внесок: формулювання завдання, участь у виконанні експерименту, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до публікації*).
42. Пат. 68871 Україна. МПК G01N 33/483, G01N 21/64 (2006.01). Набір флуоресцентних зондів для визначення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран/ Є.О. Посохов; заявник і власник патенту Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – №U201112552; заявл. 26.10.2011; опубл. 10.04.2012, Бюл. № 7.
43. Пат. 66256 Україна. МПК G01N 1/28, G01N 33/52 (2006.01). Спосіб визначення мембранотропної активності летких органічних сполук / Є.О. Посохов; заявник і власник патенту Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – №U201107786; заявл. 20.06.2011; опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24. (*Визначення змін фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран за допомогою флуоресцентних зондів*).
44. Пат. 65766 Україна. МПК G01N 1/28 (2006.01). Спосіб експрес-визначення змін фізико-хімічних властивостей мембран тромбоцитів у хворих з судинною патологією головного мозку / Є.О. Посохов; заявник і власник патенту Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – №U201107649; заявл. 17.06.2011; опубл. 12.12.2011, Бюл. № 23. (*Визначення змін фізико-хімічних властивостей мембран тромбоцитів за допомогою флуоресцентних зондів*).

Посохов Є.О. Фізико-хімічні аспекти взаємодії з ліпідними мембранами і фотоніка біологічно орієнтованих сполук, визначені методами оптичної спектроскопії. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора хімічних наук за спеціальністю 02.00.04 – фізична хімія. – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2014.

У дисертації з'ясовано, які фізичні й хімічні чинники визначають механізми взаємодії з ліпідними мембранами мембранних протеїнів та цистеїнових пептидів. Розширено можливості вивчення термодинамічних та кінетичних параметрів взаємодій біологічно орієнтованих сполук (БОС) з ліпідними мембранами, зокрема пептид-ліпідної взаємодії цистеїнових та гідрофобних пептидів і протеїн-ліпідної взаємодії мембранних протеїнів, а також фізичних і хімічних властивостей та структури ліпідних мембран і БОС шляхом розробки та впровадження нових методологічних підходів і методів оптичної спектроскопії. Вивчено природу й ефективність первинних фотофізичних і фотохімічних процесів, що відбуваються у збудженому стані деяких флуоресцентних зондів, здатних до флуоресценції фізіологічно-активних сполук і мічених органічними флуорофорами БОС.

Ключові слова: біологічно орієнтовані сполуки, механізми взаємодії з ліпідними мембранами, методи оптичної спектроскопії, термодинаміка протеїн-ліпідної взаємодії, первинні фотофізичні і фотохімічні процеси.

Посохов Е.А. Физико-химические аспекты взаимодействия с липидными мембранами и фотоника биологически ориентированных соединений, исследованные методами оптической спектроскопии. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.04 – физическая химия. – Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Харьков, 2014.

С помощью методов оптической спектроскопии были выяснены механизмы взаимодействия мембранных протеинов (аннексин B12 и транслокационный домен дифтерийного токсина) с липидными мембранами. Разработанным нами методом оценки количества мембранно-компетентной формы мембранных протеинов с рН-регулируемым встраиванием, основанным на применении флуоресцентной корреляционной спектроскопии, установлено, что образование мембранно-компетентной формы аннексина происходит у поверхности липидных мембран, в то время как такой процесс для Т-домена дифтерийного токсина происходит в объеме раствора далеко от мембран. С помощью разработанного нами нового метода оценки мембранной топологии протеинов, основанного на использовании флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении, было показано, что для аннексина B12 и для транслокационного домена дифтерийного токсина существует интермедиат встраивания в липидные мембраны, который локализуется на поверхности липидного бислоя. Установлено, что интермедиат встраивания может быть стабилизирован в зависимости от липидного состава мембран: в случае аннексина B12 интермедиат стабилизируется при высоком содержании анионного липида в составе мембран, тогда как в случае транслокационного домена дифтерийного токсина стабилизация интермедиата происходит при низком содержании анионного липида; предложенным нами методом оценки количества мембранно-компетентной формы транслокационного домена дифтерийного токсина в зависимости от рН среды, основанным на применении Фёрстеровского резонансного переноса энергии (ФРПЕ) и позволяющим проводить кинетические исследования процесса связывания протеина с мембраной, было установлено, что

мембранное связывание этого домена происходит достаточно быстро (за время < 1 минуты) и не зависит от pH и липидного состава мембран; методом измерения динамики изменения интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении установлено, что pH-зависимое встраивание транслокационного домена дифтерийного токсина (ТДДТ) в липидную мембрану происходит быстро в случае мембран большим содержанием анионного липида при низких pH, в то же время, встраивание ТДДТ в мембраны происходит медленно при более высоких pH, а также при низких значениях pH в случае мембран с малым содержанием анионного липида.

Наличие более медленного встраивания объяснено существованием pH-зависимого интермедиата встраивания, стабилизированного при высоких pH или при малом содержании анионного липида в мембране; комплексное применение Фёрстеровского резонансного переноса энергии и измерений динамики изменения интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении позволило выявить две стадии pH-зависимого взаимодействия транслокационного домена дифтерийного токсина с липидными мембранами, а именно: быстрое pH-зависимое связывание с мембранами и медленное pH-зависимое встраивание в мембраны, а также впервые установить, что эти стадии не следуют одна за другой, а встраивание ТДДТ в мембраны начинается еще до достижения его полного связывания с ними.

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия впервые использована для количественного анализа мембранных взаимодействий мембранных протеинов и гидрофобных трансмембранных пептидов: впервые была оценена свободная энергия связывания с липидными мембранами аннексина B12, для оценки термодинамики протеин-липидного взаимодействия малорастворимых в воде мембранных протеинов впервые предложен метод с использованием фторированных поверхностно-активных веществ, который позволил впервые корректно оценить свободную энергию связывания с липидной мембраной при низких pH для транслокационного домена дифтерийного токсина в условиях отсутствия его агрегации и осаждения; впервые предложен метод оценки термодинамики пептид-липидного взаимодействия малорастворимых в воде гидрофобных трансмембранных пептидов с использованием фторированных поверхностно-активных веществ, который позволил впервые оценить свободную энергию встраивания в липидную мембрану для гидрофобных пептидов различной длины.

Для улучшения точности оценки термодинамических параметров мембранного связывания цистеиновых пептидов - блокаторов ионных каналов была усовершенствована методика флуоресцентного титрования в присутствии тушителя флуоресценции. Предложенная методика успешно использована для выяснения механизма действия цистеиновых пептидов. Показано, что, несмотря на структурную близость этих пептидов, они разделяются на три типа в зависимости от их способности к взаимодействиям с липидными мембранами: первый тип - пептиды, которые связываются как с катионными, так и с анионными мембранами, второй тип - блокаторы, которые связываются только с анионными мембранами, третий тип - пептиды, которые не связываются с мембранами при физиологических значениях pH.

Предложен способ экспериментальной коррекции при оценке эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии электронного возбуждения при изучении самоассоциации пептидов/протеинов в мембранах, основанный на применении флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении. Вышеупомянутый способ был использован для проведения экспериментальной коррекции при изучении димеризации пептида FGFR3 в липидных мембранах.

Флуоресцентная спектроскопия при импульсном возбуждении применена для исследования механизма тушения флуоресценции в меченных органическими флуорофорами гистидин-содержащих пептидах, образующих комплексы с катионами переходных металлов: установлено, что Фёрстеровский резонансный перенос энергии электронного возбуждения не является механизмом тушения флуоресценции в таких гистидин-содержащих пептидных флуоресцентных системах.

Предложен набор флуоресцентных зондов для исследования изменений физико-химических свойств липидных мембран, содержащий орто-гидрокси производные 2,5-дифенил-1,3-оксазола, 2,5 дифенил-1,3,4-оксадиазола, а также 2-фенил[9,10]фенантроксазол, – который позволяет выявлять патологические изменения в мембранах тромбоцитов у пациентов с сосудистой патологией головного мозга гипертонического и атеросклеротического генеза, а также изменения в мембранах клеток обонятельного анализатора в ходе токсикологических исследований, проводить оценку мембранотропной активности криопротекторов и определять влияние магнитного поля или электромагнитного излучения на биологические мембраны.

Разработанные и применённые в диссертации спектроскопические методы и методологические подходы могут быть использованы в клинической диагностике, медико-биологических исследованиях, в биологии, биохимии.

Ключевые слова: биологически ориентированные соединения, механизмы взаимодействия с липидными мембранами, методы оптической спектроскопии, термодинамика протеин-липидного взаимодействия, первичные фотофизические и фотохимические процессы.

Posokhov Y.O. Physico-chemical aspects of interaction with lipid membranes and photonics of biologically relevant compounds studied with optical spectroscopy methods. – Manuscript.

Thesis for a Doctor of Science Degree of Chemistry Sciences Degree; speciality 02.00.04 – Physical Chemistry.- V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2014.

The physical and chemical factors, which determine the mechanisms of membrane protein or cysteine peptide interaction with lipid membranes, have been elucidated. A series of new methodological approaches and methods of optical spectroscopy have been designed and applied to facilitate the evaluation of the thermodynamic and kinetic parameters of the interactions of biologically relevant compounds (BRC) with lipid membranes (peptide-lipid interaction of cysteine and hydrophobic peptides and protein-lipid interaction of membrane proteins), and, also, to facilitate the study of physical and chemical properties and structure of lipid membranes and BRC. The nature and efficiency

of the primary photophysical and photochemical processes, occurring in the excited state of several fluorescent dyes, fluorescent physiologically active compounds and labeled with organic fluorophores BRC, have been studied. The methods, designed and applied in the dissertation, can be used in clinical diagnostics, medico-biological research, in biology, in biochemistry.

Key words: biologically relevant compounds, the mechanisms of interaction with lipid membranes, methods of optical spectroscopy, thermodynamics of protein-lipid interaction, the primary photophysical and photochemical processes.